

SOSTANZE D'ABUSO BASICHE in matrice cheratinica in GC-MS – Cod. GC49010

(Morfina, Codeina, 6-MAM, Cocaina, BEG, Cocaetilene, Ecgonina metil-estere, Amfetamina, Metamfetamina, MDA, MDMA, MDE, MBDB, Metadone, EDDP, Buprenorfina, Norbuprenorfina)

Metodo di conferma in GC-MS

INTRODUZIONE

Nei primi anni '80 iniziarono una serie di studi sulla possibilità di determinare sostanze d'abuso nella matrice cheratinica e quindi utilizzare l'analisi dei capelli come strumento per individuare l'uso pregresso di tali sostanze. Una volta incorporate nel capello, sia dalla circolazione sistemica, che dal contributo del sudore e del sebo, le sostanze d'abuso rimangono sequestrate nella matrice cheratinica in maniera stabile nel tempo in funzione della loro lipofilità, del peso molecolare, della pKa e dell'ingombro sterico.

L'analisi delle sostanze d'abuso in matrice cheratinica è un *addendum* ideale all'analisi del sangue o delle urine in quanto fornisce informazioni riguardanti una finestra di tempo precedente a quella coperta dalle altre matrici biologiche e si riferisce ad uno spazio temporale più ampio (uno o più mesi) in funzione della lunghezza del capello.

Considerando infatti una crescita media di 1 cm/mese, è possibile conoscere la storia del consumo passato analizzando il capello segmentato per cm o per frazioni o multipli di cm. E' anche possibile evidenziare contaminazioni esterne effettuando l'esame dei solventi di lavaggio confrontandoli con i risultati ottenuti dal capello digerito.

La ricerca di sostanze d'abuso nei capelli può essere utilizzata per provare un uso, un abuso e un misuse protratto nel tempo, per caratterizzarne l'intensità e la sua storia e fornire quindi dati analitici con valore medico-legale. Per questo motivo la determinazione nei capelli può essere richiesta in caso di: morti correlate all'uso di sostanze d'abuso, valutazione della idoneità alla guida, responsabilità criminali, affidamento custodia dei minori, esposizione prenatale a sostanze d'abuso ed infine quale conferma di un consumo sporadico o di una dipendenza nei lavoratori con mansioni a rischio.

I test immunochimici possono essere utilizzati come metodi iniziali al fine di analizzare in poco tempo un gran numero di campioni in maniera economica, efficace e standardizzata e di escludere i campioni che risultano negativi, ossia i campioni che non contengono la sostanza o la classe di sostanze oppure quelli in cui la concentrazione è al di sotto di un valore soglia (cut-off).

Le analisi di conferma sono definite come quelle analisi che servono a verificare le false positività dovute alla non specificità dei test di screening. Nel caso della matrice cheratinica, poiché non esistono veri e propri test di screening non si può parlare di vere e proprie “analisi di conferma”. La “Society of Hair Testing” (SOHT) raccomanda l'utilizzo di metodologie separative cromatografiche accoppiate alla rivelazione in spettrometria di massa per la determinazione di sostanze d'abuso in matrice cheratinica a fini medico-legali e/o clinici.

Tenendo in considerazione le linee guida della SOHT, il presente metodo consente di determinare tutte le sostanze d'abuso basiche (6-MAM, Morfina, Codeina, Cocaina, BEG, Cocaetilene, Amfetamina, Metamfetamina, MDA, MDMA, MDE, MBDB, Metadone, Buprenorfina, EDDP, Norbuprenorfina, Ecgonina metil-estere) previa estrazione di tali molecole dalla matrice cheratinica (capelli o peli) e successiva estrazione in fase solida su colonna (SPE) degli analiti di interesse (per eliminare la presenza di interferenti della matrice complessa) e determinazione in Gas Cromatografia/spettrometria di massa (GC/MS).



EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com



CE

N° 005	Sostanze d'Abuso in matrice cheratinica	09/2024
--------	---	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare la **Morfina**, la **Codeina**, la **6-Monoacetilmorfina**, la **Cocaina**, la **BEG**, la **Cocaetilene**, il **Metadone**, l'**Amfetamina**, la **Metamfetamina**, l'**MDMA**, l'**MDA**, l'**MDE**, l'**MBDB**, la **Buprenorfina**, l'**EDDP**, la **Norbuprenorfina**, l'**Ecgonina metil-estere** previa idrolisi della matrice cheratinica, estrazione SPE e lettura in GC-MS.

Il metodo è stato validato secondo i criteri stabiliti a livello internazionale dalla FDA e dall'ICH.

Valori di cut-off secondo la Society of Hair Testing (SOHT)

Cut-off di screening secondo le raccomandazioni SOHT			Cut-off di conferma secondo le raccomandazioni SOHT	Cut-off di conferma secondo il provvedimento 18/09/2008 sui lavoratori con mansioni a rischio
Classe di sostanza	Cut-off (ng/mg)	Analita	Cut-off (ng/mg)	Cut-off (ng/mg)
Amfetamine	0,2	Amfetamina	0,2	0,2
		Metamfetamina	0,2	0,2
		MDA	0,2	0,2
		MDMA	0,2	0,2
		MDEA	-	0,2
Cannabinoidi	0,1	THC	0,05	0,1
		THC-COOH	0,0002	-
Cocaina	0,5	Cocaina	0,5	0,2
		BEG, EME, CE, NC*	0,05	0,05
Oppiacei	0,2	Morfina	0,2	0,2
		Codeina	0,2	0,2
		6-MAM†	0,2	0,2
Metadone	0,2	Metadone	0,2	0,2
		EDDP	0,05	-
Buprenorfina	0,01	Buprenorfina	0,01	0,05
		Norbuprenorfina	0,01	-

* BEG: benzoilecgonina, EME: ecgoninametilestere, CE: cocaetilene, NC: norcocaina
† 6-MAM – 6-monoacetilmorfina

Valori di cut-off secondo il Gruppo di Tossicologi Forensi Italiani (GTFI)

Valori di cut-off in matrice pilifera

(il GTFI ritiene non validi metodi di screening immunochimici per questa matrice biologica in quanto ancora forieri, per la maggior parte, di risultati "falsi negativi")

Classe di sostanze o sostanza	Cut-off/ conferma (ng/mg)
Oppiacei	
morfina	0,2
codeina	0,2
6-acetilmorfina	0,2
Cocaina (cocaina)	
cocaina	0,5
benzoilecgonina	0,05
ecgonina metilestere	0,05
cocaetilene	0,05
Amfetamina e congeneri	
amfetamina	0,2
metamfetamina	0,2
3,4-Metilendirossimetamfetamina e congeneri	
MDMA	0,2
MDA	0,2
MDEA	0,2
MBDB	0,2
Metadone	
metadone	0,2
EDDP	0,2
Cannabinoidi	
THC	0,05
THC-COOH	0,001
Buprenorfina	
buprenorfina	0,01
norbuprenorfina	0,01

Valore di cut-off secondo la Gazzetta Ufficiale:

Oppiacei, Amfetamine, Cocaina, Metadone:

0.2 ng/mg

BEG, Buprenorfina:

0.05 ng/mg

Rif. Gazzetta Ufficiale n°236 – 8 ott 2008

ANALITA	Accuratezza intra-giorno			Precisione intra-giorno			CV% inter-giorno		
	(Errore %)			(CV%)			(Errore %)		
	Calibratore			Calibratore			Calibratore		
	Inferiore	Medio	Superiore	Inferiore	Medio	Superiore	Inferiore	Medio	Superiore
AMFETAMINA	13,6	4,8	6,5	3,8	3,9	0,6	6,4	7,3	2,1
METAMFETAMINA	17,0	12,8	11,9	10,2	4,9	4,7	18,0	14,0	15,3
3,4-MDMA	13,6	6,0	6,4	2,7	7,8	5,7	13,6	8,5	6,5
3,4- MDA	8,9	8,7	7,5	6,5	10,2	5,8	6,8	9,6	9,0
3,4-MDE	7,1	7,0	16,9	2,7	8,4	6,6	3,3	10,1	7,3
BENZOILECGONINA	9,9	6,4	8,7	8,6	3,9	4,4	13,3	8,0	10,6
COCAETILENE	9,9	8,9	6,2	1,3	4,1	5,1	10,7	7,6	5,9
COCAINA	9,4	9,5	6,7	10,4	11,0	7,8	10,2	12,3	7,4
MORFINA	8,5	10,5	9,0	9,0	5,9	6,4	8,7	9,9	7,9
6-MAM	7,7	4,1	1,2	5,9	2,9	0,8	6,2	4,0	0,9
ECGONINA METIL ESTERE	13,0	6,0	3,9	7,7	5,5	4,5	7,0	6,8	3,8
CODEINA	9,6	12,7	12,2	3,3	6,2	6,7	9,0	5,3	14,6
NORBUPRENORFINA	16,7	7,7	2,9	2,6	9,1	9,0	17,9	10,6	8,6
METADONE	11,1	3,8	5,9	6,4	3,7	2,7	8,6	4,9	5,5
EDDP	7,7	4,3	7,1	8,0	6,4	7,7	8,4	5,9	9,3
BUPRENORFINA	7,7	5,7	10,8	2,0	7,3	4,9	8,7	8,2	9,4
MBDB	15,5	6,4	11,9	1,5	5,2	6,7	2,1	5,2	7,4

ANALITA	(Coefficiente di correlazione R2) $\pm$ deviazione standard	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)
AMFETAMINA	0,9991 $\pm$ 0,0012	0,003	0,1
METAMFETAMINA	0,9991 $\pm$ 0,0008	0,003	0,1
3,4-MDMA	0,9986 $\pm$ 0,0013	0,003	0,1
3,4- MDA	0,9998 $\pm$ 0,0001	0,003	0,1
3,4-MDE	0,9979 $\pm$ 0,0022	0,003	0,1
BENZOILECGONINA	0,9996 $\pm$ 0,0004	0,016	0,05
COCAETILENE	0,9996 $\pm$ 0,0006	0,006	0,02
COCAINA	0,9999 $\pm$ 0,0001	0,083	0,25
MORFINA	0,9997 $\pm$ 0,0005	0,003	0,1
6-MAM	0,9992 $\pm$ 0,0009	0,003	0,1
ECGONINA METIL ESTERE	0,9998 $\pm$ 0,0001	0,006	0,02
CODEINA	0,9984 $\pm$ 0,0026	0,003	0,1
NORBUPRENORFINA	0,9973 $\pm$ 0,0031	0,003	0,01
METADONE	0,9996 $\pm$ 0,0004	0,003	0,1
EDDP	0,9999 $\pm$ 0,0001	0,003	0,1
BUPRENORFINA	0,9990 $\pm$ 0,0013	0,0016	0,005
MBDB	0,9986 $\pm$ 0,0012	0,003	0,1

ANALITA	Recupero (%)		
	Calibratore		
	Inferiore	Medio	Superiore
AMFETAMINA	129	70	84
METAMFETAMINA	90	66	66
3,4-MDMA	76	86	81
3,4-MDA	90	83	109
3,4-MDE	84	80	83
BENZOILECGONINA	56	91	76
COCAETILENE	72	84	71
COCAINA	69	71	61
MORFINA	71	97	100
6-MAM	55	53	50
ECGONINA METIL ESTERE	70	75	44
CODEINA	75	83	74
NORBUPRENORFINA	82	97	47
METADONE	80	74	60
EDDP	50	51	52
BUPRENORFINA	68	79	65
MBDB	77	76	81

La tabella sottostante riporta, per ogni analita, le concentrazioni corrispondenti ai Calibratori i cui valori Inferiore, Medio e Superiore citati sopra fanno riferimento.

ANALITA	Concentrazione (ng/mg)		
	Calibratore		
	Inferiore	Medio	Superiore
AMFETAMINA	0,15	1	5
METAMFETAMINA	0,15	1	5
3,4-MDMA	0,15	1	5
3,4-MDA	0,15	1	5
3,4-MDE	0,15	1	5
BENZOILECGONINA	0,075	0,5	2,5
COCAETILENE	0,03	0,2	1
COCAINA	0,37	2,5	25
MORFINA	0,15	1	5
6-MAM	0,15	1	5
ECGONINA METIL ESTERE	0,03	0,2	1
CODEINA	0,15	1	5
NORBUPRENORFINA	0,0015	0,1	0,5
METADONE	0,15	1	5
EDDP	0,15	1	5
BUPRENORFINA	0,007	0,05	0,250
MBDB	0,15	1	5

<u>Contenuto della Confezione (50 test) :</u>		Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2 – 8 °C.
Reagente A – Soluzione Diluente, 2 x 10 ml		
Reagente B – Soluzione Tampone, 1 x 100 ml		
Reagente C – Soluzione Condizionamento 1 e Lavaggio 3, 1 x 250 ml		
Reagente D – Soluzione Condizionamento 2, 1 x 100 ml		
Reagente E – Soluzione Eluente, 1 x 100 ml		
Reagente F – Soluzione Lavaggio 1, 1 x 100 ml		
Reagente G – Soluzione Lavaggio 2, 1 x 100 ml		
Reagente H – Soluzione di Derivatizzazione 1 per Amfetamine, 2 x 1 ml		<u>Vedi Avvertenze - Per il prelievo del Reagente H, utilizzare la siringa Hamilton da 50 ul Cod. ZRE24533</u>
Reagente I – Soluzione di Derivatizzazione 2 per Amfetamine, 1 x 1 ml		<u>Stoccare a –20 °C prima dell'apertura.</u>
Reagente L – Soluzione Test Amfetamine, 1 x 1 ml		<u>Vedi Avvertenze</u>
Reagente N – Soluzione Test Oppiacei, Metadone, Cocaina, Buprenorfina e metaboliti 1 x 0,5 ml		<u>Vedi Avvertenze</u>
Reagente M1 – Soluzione Derivatizzante 1, 2 x 1 ml (2 ampolle da 1 ml)		<u>Vedi Avvertenze - Per il prelievo del Reagente M, utilizzare la siringa Hamilton da 50 ul Cod.ZRE24533</u> <u>Stoccare a Temperatura Ambiente prima e dopo l'apertura.</u>
Reagente M2 – Soluzione Derivatizzante 2, 2 x 1 ml (2 ampolle da 1 ml)		<u>Vedi Avvertenze - Per il prelievo del Reagente M, utilizzare la siringa Hamilton da 50 ul Cod.ZRE24533</u> <u>Vedi Avvertenze</u>
Reagente O – Soluzione Standard Interno per Sostanze Basiche, 1 x 1 ml		<u>Vedi Avvertenze</u>
Reagente P – Soluzione Standard Interno per Amfetamine, 1 x 1 ml		<u>Vedi Avvertenze</u>
Reagente Q – Soluzione Estraiante, 1 x 50 ml		
Reagente R – Soluzione Lavaggio del capello, 1 x 250 ml		
Reagente S - Capello bianco, 1 x 2000 mg		
Reagente T1 – Sol. Standard Chimico 1, 1 x 400 µl		<u>Vedi Avvertenze</u>
Reagente T2 – Sol. Standard Chimico 2, 1 x 400 µl		<u>Vedi Avvertenze</u>
Reagente T3 – Sol. Standard Chimico 3, 1 x 400 µl		<u>Vedi Avvertenze</u>
Reagente V – Soluzione Stabilizzante, 1 x 2,5 ml		
Colonnine Clean-up, 50 pz		
<u>Dotazione strumentale minima richiesta :</u>		Strumento GC-MS Computer gestionale

Dotazione opzionale :

Autocampionatore

Modalità di prelievo dei capelli :

Lunghezza raccomandata: 5 cm, partendo dal cuoio capelluto. Viene recisa una ciocca, non strappata (il bulbo non ha nessuno scopo al fine dei presenti accertamenti) nella regione del vertice posteriore del capo, di almeno 200 mg che viene suddivisa in 2 aliquote di simile peso (A e B) di ognuna delle quali viene fissata l'estremità prossimale. Tali aliquote vengono inserite in contenitori separati non trasparenti recanti tappi a chiusura ermetica e sigillati con nastro inamovibile e conservati a temperatura ambiente. Il taglio del capello deve essere eseguito con forbici pulite con una piccola quantità di alcol e ben asciutte.

Modalità di prelievo del pelo :

E' necessario tagliare 200 mg di peli dalla regione pubica; i peli così raccolti vengono suddivisi in due aliquote (A e B).

PROCEDURA PREANALITICA per tutte le sostanze d'abuso basiche ad ECCEZIONE delle AMFETAMINE:

FASE 1 : In una provetta di vetro con tappo a vite in teflon pipettare :

- 50 µl di **Reagente N** – Soluzione Test Oppiacei, Metadone, Cocaina, Buprenorfina e metaboliti

Conservazione Test: una volta aperta la vial prelevarne il volume necessario, richiuderla e conservarla a -20 °C.

FASE 2 : Portare a secco con l'ausilio di un flusso di elio o di azoto (in questo step la Temperatura di lavoro deve essere < 40 °C)

FASE 3 : Riprendere con 25 µl di **Reagente M1** - Soluzione Derivatizzante 1 + 25 µl di **Reagente M2** - Soluzione Derivatizzante 2 (utilizzando l'apposita siringa Hamilton da 50 µl (cod. ZRE24533)

Chiudere ermeticamente la provetta con il tappo

Al vortex per 20 secondi

FASE 4 : Porre in stufa a 70 °C per 20 minuti

Raffreddare a Temperatura ambiente

Aprire la provetta di vetro

FASE 5 : Trasferire tutto il campione in vials con riduttore di volume per autocampionatore

NOTA: Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 2 µl di questa soluzione appena preparata nel Gas Cromatografo per identificare il tempo di ritenzione e lo spettro di massa di tutte le sostanze basiche che devono essere simili a quelli riportati nelle Figure sottostanti. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico.

PROCEDURA PREANALITICA per le AMFETAMINE:

FASE 1 : In una provetta di vetro con tappo in teflon a vite pipettare :

- 100 µl di **Reagente L – Soluzione Test Amfetamine**

FASE 2 : Portare a secco con l'ausilio di un flusso elio o azoto (in questo step la Temperatura di lavoro deve essere < 40 °C)

FASE 3 : Riprendere con 35 µl di **Reagente H - Soluzione di Derivatizzazione 1 per Amfetamine** utilizzando l'apposita siringa Hamilton da 50 µl (cod. ZRE24533)

Chiudere ermeticamente la provetta con il tappo

Al vortex per 20 secondi

FASE 4: Porre in stufa a 80 °C per 5 minuti

Raffreddare a Temperatura ambiente

Aprire la provetta di vetro

FASE 5 : Aggiungere 15 µl di **Reagente I - Soluzione di Derivatizzazione 2 per Amfetamine**

Chiudere ermeticamente la provetta con il tappo

Al vortex per 20 secondi

FASE 6: Porre in stufa a 80 °C per 5 minuti

Raffreddare a Temperatura ambiente

Aprire la provetta di vetro

FASE 7 : Trasferire tutto il campione in vials di vetro con riduttore di volume per autocampionatore

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 2 µl di questa soluzione appena preparata nel Gas Cromatografo per identificare il tempo di ritenzione e lo spettro di massa delle amfetamine che devono essere simili a quelli riportati nelle Fig. sottostanti. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico.

N.B.: si consiglia di utilizzare siringhe differenti per i Reagenti di derivatizzazione H e per i Reagenti M1 e M2.

PROCEDURA ANALITICA:

A) PREPARAZIONE dei Campioni incogniti

FASE 1 : Lavare i capelli/peli integri dentro una provetta di vetro da 10 ml con 2 ml di **Reagente R – Soluzione Lavaggio del capello**

Chiudere ermeticamente la provetta con il tappo

Vortexare per 1 minuto

Centrifugare a 3.500 rpm per 5 minuti

Aprire la provetta di vetro

FASE 2 : Portare a secco il solvente con l'ausilio di un leggero flusso di elio o di azoto ponendo attenzione a far rimanere il capello/pelo sul fondo della provetta. In alternativa prelevare, con una pinza pulita con Acetone (non fornito nel kit), il capello/pelo dalla provetta ed appoggiarlo su carta assorbente finché non è completamente asciutto. In questo ultimo caso la carta assorbente va cambiata per ogni campione.

Ripetere le Fasi 1 e 2 per due volte consecutive

FASE 3 : Tagliare i capelli/peli, lavati ed asciugati, in segmenti di 1-2 cm con forbici pulite con Acetone (non fornito nel kit)

FASE 4 : Pesare un'aliquota di campione, compresa tra 20 e 50 mg a seconda della disponibilità del campione, in una provetta di vetro in pyrex con tappo a vite pulita e precedentemente denominata.

B) PREPARAZIONE dei CALIBRATORI SU 6 LIVELLI

Preparazione degli Standard Chimici per gli arricchimenti successivi:

Preparare 3 provette di vetro, denominarle 1 A; 1 B; 1 C e diluirvi ogni singolo Standard Chimico (T1-T2-T3) con **Reagente A – Soluzione Diluente** come riportato nella tab. sotto:

Provette	<u>Reagente T1 –</u> Sol. Standard Chimico 1	<u>Reagente T2 –</u> Sol. Standard Chimico 2	<u>Reagente T3 –</u> Sol. Standard Chimico 3	<u>Reagente A –</u> Sol . Diluente
1 A	10 µl	//	//	990 µl
1 B	//	10 µl	//	990 µl
1 C	//	//	10 µl	990 µl

Chiudere le provette con il tappo – Vortexare per 1 minuto

Preparare 6 provette di vetro da 10 ml denominate C0-C1-C2-C3-C4-C5.

Aggiungere in ciascuna provetta (C0-C1-C2-C3-C4-C5) gli standard chimici appena preparati (1A, 1B, 1C) e i **Reagenti T1-T2-T3** facendo riferimento alla tabella riportata sotto:

Calibratore C0	Calibratore C1	Calibratore C2	Calibratore C3	Calibratore C4	Calibratore C5
50 µl di Reagente A – Sol. Diluente	10 µl di 1 A	20 µl di 1 A	100 µl di 1 A	5 µl di <u>Reagente T1</u>	10 µl di <u>Reagente T1</u>
50 µl di Reagente A – Sol. diluente	10 µl di 1 B	20 µl di 1 B	100 µl di 1 B	5 µl di <u>Reagente T2</u>	10 µl di <u>Reagente T2</u>
50 µl di Reagente A – Sol. diluente	10 µl di 1 C	20 µl di 1 C	100 µl di 1 C	5 µl di <u>Reagente T3</u>	10 µl di <u>Reagente T3</u>

Portare a secco ogni calibratore appena preparato con l'ausilio di un flusso elio o azoto (in questo step la Temperatura di lavoro deve essere < 40 °C).

Aggiungere ad ogni provetta dei calibratori C0-C1-C2-C3-C4-C5 appena portate a secco, 50 mg di **Reagente S – Capello bianco** (fornito nel kit).

A questo punto i Calibratori su 6 punti sono pronti e le concentrazioni da utilizzare per la curva di calibrazione saranno:

Analita	Calibratore C0	Calibratore C1	Calibratore C2	Calibratore C3	Calibratore C4	Calibratore C5
Morfina, Codeina, 6-MAM, Amfetamina, Metamfetamina, MDA, MDE, MDMA, Metadone, EDDP, MBDB	0 ng/mg	0.1 ng/mg	0.2 ng/mg	1 ng/mg	5 ng/mg	10 ng/mg
Cocaina	0 ng/mg	0.25 ng/mg	0.5 ng/mg	2.5 ng/mg	12.5 ng/mg	25 ng/mg
Cocaetilene, Ecgonina metil-estere	0 ng/mg	0.02 ng/mg	0.04 ng/mg	0.2 ng/mg	1 ng/mg	2 ng/mg
Buprenorfina	0 ng/mg	0.005 ng/mg	0.01 ng/mg	0.05 ng/mg	0.25 ng/mg	0.5 ng/mg
Norbuprenorfina	0 ng/mg	0.01 ng/mg	0.02 ng/mg	0.1 ng/mg	0.5 ng/mg	1 ng/mg
Beg	0 ng/mg	0.05 ng/mg	0.1 ng/mg	0.5 ng/mg	2.5 ng/mg	5 ng/mg

C) PREPARAZIONE DEGLI STANDARD INTERNI

Il **Reagente O** – Sol Standard interno per Sostanze Basiche ed il **Reagente P** – Sol. Standard interno per Amfetamine forniti nel kit vanno diluiti 1:10 con acqua prima di ogni utilizzo, nella quantità necessaria per l'intera seduta analitica.

ES. per una seduta analitica con 20 campioni incogniti e 5 calibratori sono necessari 625 µl di ogni Standard Interno diluito (**Reagente O-diluito** e **Reagente P-diluito**). Pertanto si prelevano 62.5 µl di **Reagente O** – Sol Standard interno per Sostanze Basiche e 62.5 µl di **Reagente P** – Sol. Standard interno per Amfetamine e si diluiscono rispettivamente con 562.5 µl di H₂O in due provette di vetro. Al vortex per almeno 10 sec. Le soluzioni sono ora pronte per l'uso.

Il **Reagente O** – Sol Standard interno per Sostanze Basiche ed il **Reagente P** – Sol. Standard interno per Amfetamine non diluiti e non utilizzati si richiudono ermeticamente e si conserva la quantità residua in congelatore a -20°C.

D) DIGESTIONE DELLE MOLECOLE DAL CAPELLO/PELO

FASE 5 : In ogni tubo precedentemente preparato (FASE A e FASE B) dispensare:

	Calibratore C0 (preparato nella Fase B)	Calibratore C1 (preparato nella Fase B)	Calibratore C2 (preparato nella Fase B)	Calibratore C3 (preparato nella Fase B)	Calibratore C4 (preparato nella Fase B)	Calibratore C5 (preparato nella Fase B)	Controlli	Campioni (preparati nella Fase A)
Reagente O diluito - (Sol. Std interno x Sostanze BASICHE diluito come indicato nella FASE C)	25 ul	25 ul	25 ul	25 ul	25 ul	25 ul	25 ul	25 ul
Reagente P diluito - (Sol. Std interno x Amfetamine diluito come indicato nella FASE C)	25 ul	25 ul	25 ul	25 ul	25 ul	25 ul	25 ul	25 ul
Reagente Q - Sol. Estraiante	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Chiudere ermeticamente le provette con il tappo – Agitare delicatamente senza capovolgere le provette per 10 secondi

FASE 6 : Porre in stufa a 45 °C per 18 ore

Raffreddare a Temperatura ambiente.

Aprire la provetta di vetro

FASE 7 : Aggiungere ad ogni provetta 2 ml di **Reagente B** - Sol. Tampone + 45 µl di **Reagente V** – Soluzione Stabilizzante

Controllare che il pH sia = 6.0 ± 0.2 con cartine indicatrici di pH (immergere la punta di una pipetta pasteur o di un puntale nel tubo; utilizzare una pipetta diversa per ogni tubo). Nel caso eventuale che il pH non sia corretto, si possono effettuare delle correzioni con Idrossido di Sodio 0.1 M e Acido Cloridrico 0.1 M miscelando e ricontrollando il pH dopo ogni aggiunta.

Chiudere le provette e vortexare per 1 minuto

Centrifugare a 3.500 rpm per 5 minuti

E) ESTRAZIONE DEGLI ANALITI

FASE 8 : Condizionamento delle colonnine SPE

Preparare un numero di colonnine corrispondenti alla somma dei calibratori, controlli e campioni incogniti

- Aggiungere 1,5 ml di **Reagente C – Soluzione di Condizionamento 1 e Lavaggio 3**
Far passare in colonnina e scartare l'eluato senza portare a secco la colonnina
- Aggiungere 2 ml di **Reagente D – Soluzione di Condizionamento 2**
Far passare in colonnina e scartare l'eluato senza portare a secco la colonnina

FASE 9 : Aggiungere tutto il surnatante dei calibratori, controlli e campioni incogniti, preparati nelle fasi 5-7, nelle colonnine condizionate e scaricare ad un flusso di 1 ml/ minuto (goccia a goccia) anche con l'ausilio di un vuoto moderato.

FASE 10 : Lavaggio delle colonne SPE

- Lavare con 2 ml di **Reagente F – Soluzione di Lavaggio 1**
Far passare in colonnina e scartare l'eluato
- Lavare con 2 ml di **Reagente G – Soluzione di Lavaggio 2**
Far passare in colonnina e scartare l'eluato
- Lavare con 2 ml di **Reagente C – Soluzione di Condizionamento 1 e Lavaggio 3**
Far passare in colonnina e scartare l'eluato portando a secco con un leggero flusso d'aria

F) ELUIZIONE e DERIVATIZZAZIONE DEGLI ANALITI

Eluire **rigorosamente** in provette di vetro in pyrex con tappo

SI DISTINGUONO 2 CASI:

- 1) **Nel caso in cui il campione è risultato positivo allo screening solamente per la classe delle Amfetamine:**

Eluire con 1 ml di Reagente E – Soluzione Eluente

Portare a secco con un leggero flusso d'aria

Raccogliere l'eluato su provette in pyrex con tappo a vite

Portare a secco l'eluato con l'ausilio di un flusso di elio o di azoto (in questo step la Temperatura di lavoro deve essere < 40 °C)

Derivatizzazione: Aggiungere in ogni provetta 35 µl di Reagente H – Soluzione di Derivatizzazione 1 per Amfetamine utilizzando l'apposita siringa Hamilton da 50 µl (cod. ZRE24533)

Chiudere ermeticamente la provetta con il tappo

Porre in stufa a 80°C x 5 min

Raffreddare a temperatura ambiente

Aprire la provetta di vetro

Aggiungere 15 µl di Reagente I – Soluzione di Derivatizzazione 2 per Amfetamine

Chiudere ermeticamente la provetta con il tappo

Porre in stufa a 80°C x 5 min

Raffreddare a temperatura ambiente

Aprire la provetta di vetro

Iniezione: Trasferire il derivatizzato nelle vial con riduttore di volume ed iniettare 2 µl nel Gascromatografo.

- 2) **Nel caso in cui il campione è risultato positivo allo screening solamente per la classe degli Oppiacei, Metadone, Cocaina, Buprenorfina:**

Eluire con 1 ml di Reagente E – Soluzione Eluente

Portare a secco con un leggero flusso d'aria

Raccogliere l'eluato su provette in pyrex con tappo a vite

Portare a secco l'eluato con l'ausilio di un flusso di elio o di azoto (in questo step la Temperatura di lavoro deve essere < 40 °C)

Derivatizzazione: Aggiungere in ogni provetta 25 µl di Reagente M1 – Soluzione Derivatizzante 1 + 25 µl di Reagente M2 – Soluzione Derivatizzante 2 utilizzando l'apposita siringa Hamilton da 50 µl (cod. ZRE24533)

Chiudere ermeticamente la provetta con il tappo

Porre in stufa a 70°C x 20 min

Raffreddare a temperatura ambiente

Aprire la provetta di vetro

Iniezione: Trasferire il derivatizzato nelle vial con riduttore di volume ed iniettare 2 µl nel Gascromatografo.

N.B.: si consiglia di utilizzare siringhe differenti per i Reagenti di derivatizzazione H e per i Reagenti M1 e M2.

CONSIDERAZIONI GENERALI sul CALCOLO QUANTITATIVO dei CAMPIONI INCOGNITI

Il calcolo dei campioni incogniti viene eseguito in funzione dell'equazione ottenuta per la curva di calibrazione dove si riporta sull'asse delle ascisse la concentrazione in ng/mg e sull'asse delle ordinate il rapporto tra le aree dell'analita/standard interno.

Per il calcolo della concentrazione in ng/mg capello/pelo nel caso dei campioni incogniti, si ricorda che una volta ottenuto il valore di concentrazione sulla retta, esso va moltiplicato per i mg di capello/pelo con cui si è costruita la retta di calibrazione (50 mg) e diviso per il peso effettivo del campione in esame (es. 20 mg qualora si sia pesata questa quantità di capello/pelo).

SOSTANZE D'ABUSO in matrice cheratinica - Avvertenze

REAGENTE N: SOLUZIONE TEST OPPIACEI, METADONE, COCAINA, BUPRENORFINA E METABOLITI

Morfina Codeina 6-Monoacetilmorfina Ecgonina Metil Estere Norbuprenorfina Metadone BEG Cocaetilene Cocaina Buprenorfina EDDP	Circa 10.000 ng/ml
Conservazione: Una volta aperta la vial, prelevarne il volume necessario, richiuderla con il reagente non utilizzato e conservare a -20°C.	

REAGENTE L: SOLUZIONE TEST AMFETAMINE

Amfetamina Metamfetamina MDA MDMA MDE MBDB	Circa 10.000 ng/ml
Conservazione: Una volta aperta la vial, prelevarne il volume necessario, richiuderla con il reagente non utilizzato e conservare a -20°C.	

REAGENTE T1: SOLUZIONE STANDARD CHIMICO 1

Amfetamina Metamfetamina MDA MDMA MDE EDDP Morfina Codeina MBDB Beg	50.000 ng/ml 50.000 ng/ml 50.000 ng/ml 50.000 ng/ml 50.000 ng/ml 50.000 ng/ml 50.000 ng/ml 50.000 ng/ml 50.000 ng/ml 25.000 ng/ml
Conservazione: Una volta aperta la vial, prelevarne il volume necessario, richiuderla con il reagente non utilizzato e conservare a -20°C.	

REAGENTE T2: SOLUZIONE STANDARD CHIMICO 2

Cocaina Metadone 6-MAM	125.000 ng/ml 50.000 ng/ml 50.000 ng/ml
Conservazione: Una volta aperta la vial, prelevarne il volume necessario, richiuderla con il reagente non utilizzato e conservare a -20°C.	

REAGENTE T3: SOLUZIONE STANDARD CHIMICO 3

Ecgonina Metil Estere Cocaetilene Buprenorfina Norbuprenorfina	10.000 ng/ml 10.000 ng/ml 2.500 ng/ml 5.000 ng/ml
Conservazione: Una volta aperta la vial, prelevarne il volume necessario, richiuderla con il reagente non utilizzato e conservare a -20°C.	

REAGENTE H: SOLUZIONE DERIVATIZZANTE 1 PER AMFETAMINE

Una volta aperta un'ampolla trasferire tutto il contenuto, 1 ml, in una vial di vetro. Chiudere bene il tappo e conservare a 2-8 °C.

REAGENTE I: SOLUZIONE DERIVATIZZANTE 2 PER AMFETAMINE

Una volta aperta un'ampolla trasferire tutto il contenuto, 1 ml, in una vial di vetro. Chiudere bene il tappo e conservare a -20 °C.

REAGENTE M1: SOLUZIONE DERIVATIZZANTE 1

Una volta aperta un'ampolla trasferire tutto il contenuto, 1 ml, in una vial di vetro. Chiudere bene il tappo e conservare a Temperatura Ambiente.

REAGENTE M2: SOLUZIONE DERIVATIZZANTE 2

Una volta aperta un'ampolla trasferire tutto il contenuto, 1 ml, in una vial di vetro. Chiudere bene il tappo e conservare a 2-8 °C.

REAGENTE O: SOLUZIONE STANDARD INTERNO PER SOSTANZE BASICHE

Nalorfina	100.000 ng/ml
Conservazione: il reagente va stoccato a – 20 °C	

REAGENTE P: SOLUZIONE STANDARD INTERNO PER AMFETAMINE

MDPA	100.000 ng/ml
Conservazione: il reagente va stoccato a – 20 °C	

CONDIZIONI DEL GAS-CROMATOGRAFO : (tali condizioni possono essere variate in funzione dello strumento utilizzato)

• Colonna VF-5ms o Rxi-5Sil MS 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm (dopo averla condizionata seguendo le indicazioni del fornitore) • Temperatura iniettore 280 °C • Rapporto di Splittaggio Inizio: ON split 20 0 min: OFF 1 min: ON split 100 3 min: ON split 20 NB: Il rapporto di splittaggio può essere variato a seconda dello strumento utilizzato • Programmata Termica per Amfetamine: 110 °C x 3,25 minuti 110-250°C a 20 °C/min 250°C x 1 minuto, 250-300°C a 40 °C/min 300x 6,5 minuti (corsa 19 minuti) • Programmata Termica per altre molecole basiche (ad eccezione delle Amfetamine): 120 °C x 3,25 minuti 120-250°C a 20 °C/min 250°C x 1 minuto, 250-300°C a 40 °C/min 300x 6 minuti (corsa 18 minuti) • Flusso Gas Elio 1 ml/min Gas

CONDIZIONI DETECTOR DI MASSA (4000) : (tali condizioni possono essere variate in funzione dello strumento utilizzato)

• Range di Massa 80 – 300 m/z (per Amfetamine) • Range di Massa 70 – 540 m/z (per altre Sostanze basiche) • Temperatura della Massa: 180 °C; • Temperatura Transfer Line: 270 °C; • Temperatura Manifold: 80 °C • Filamento on: 3 minuti

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA VF-5 MS o Rxi-5Sil MS

Seguire le prescrizioni del costruttore.

PULIZIA DELLA COLONNA VF-5 MS o Rxi-5Sil MS

Qualora le performance analitiche subiscano rilevanti modifiche (es. scarsa sensibilità o presenza di interferenti nei cromatogrammi), è necessario effettuare la pulizia della colonna come riportato secondo le indicazioni del fornitore.

LAVAGGIO DELL'AUTOCAMPIONATORE

Lavare la siringa prima di ogni iniezione con ACETONE.

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
GC49016	Calibratore in matrice cheratinica per Sostanze d'Abuso	1 x 2000 mg/ 1 x 3 x 0,3 ml/ 1 x 20 ml
GC49019	Controllo in matrice cheratinica per Sostanze d'Abuso – Livelli 1 e 2	1 x 2000 mg/ 1 x 3 x 0,5 ml/ 1 x 30 ml
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 Pz
S29046U	Tappi per Vial standard di vetro da 2 ml	1 x 100 PZ
S24717	Riduttori di volume per vials da 2 ml	1 x 100 Pz
Z1636/26	Provette in Pyrex da 10 ml con tappo SWL	1 x 40 Pz
SCP8944	Colonna VF-5MS (30 m x 0,25 mm - 0,25 µm)	1 Pz
S13623	Colonna Rxi-5Sil MS (30 m x 0,25 mm – 0,25 µm)	1 Pz
ZRE24533	Siringa Hamilton da 50 ul	1 Pz

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

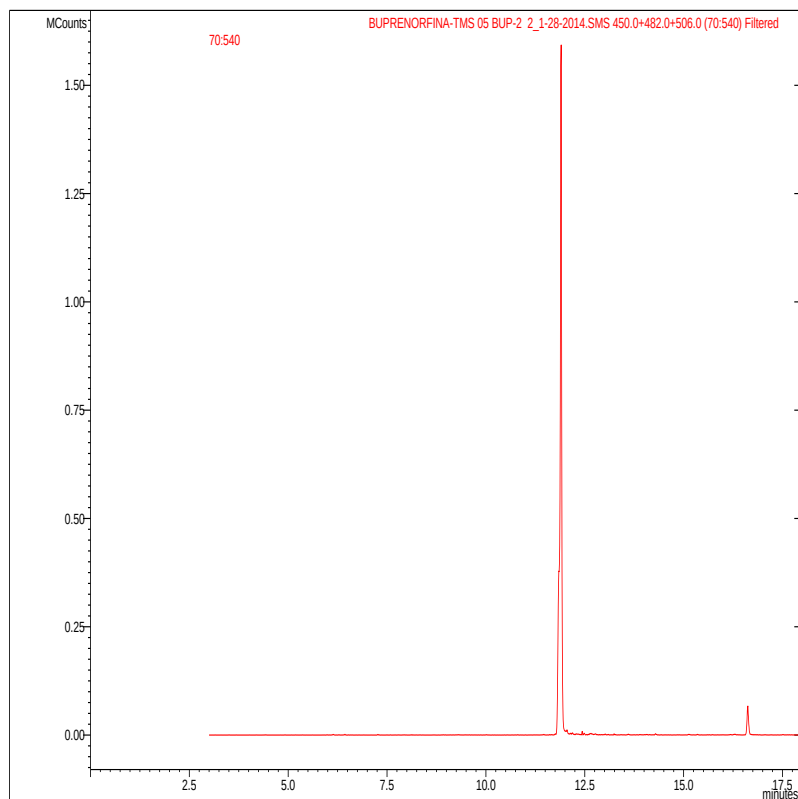


Fig. 1 :	Soluzione Test Buprenorfina
	R.T. 11.9 Buprenorfina

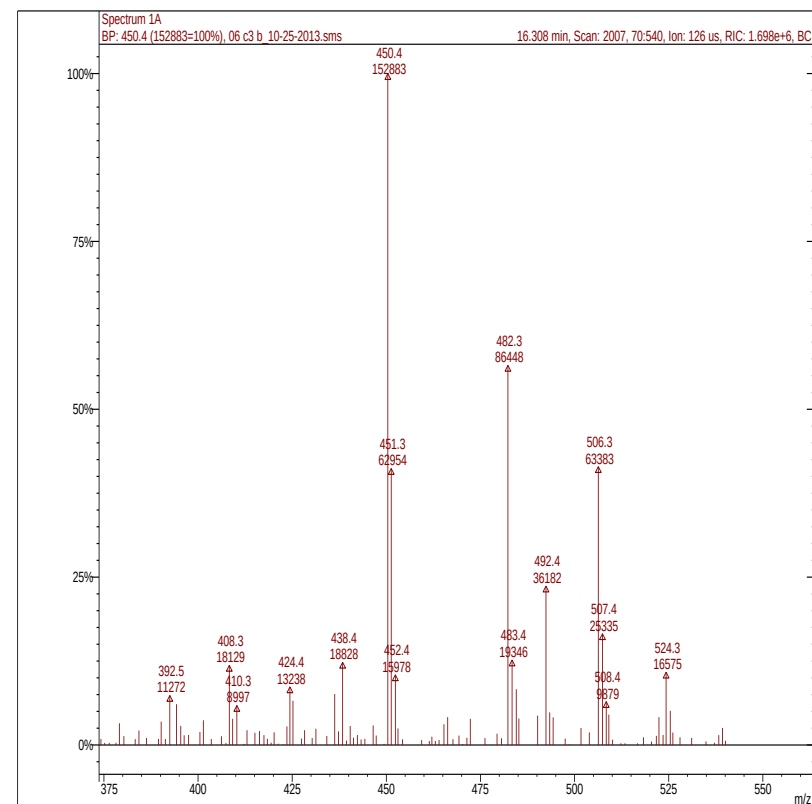


Fig. 2 :	Spettro di Massa della Buprenorfina
	IONI MOLECOLARI: 450-482-506

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

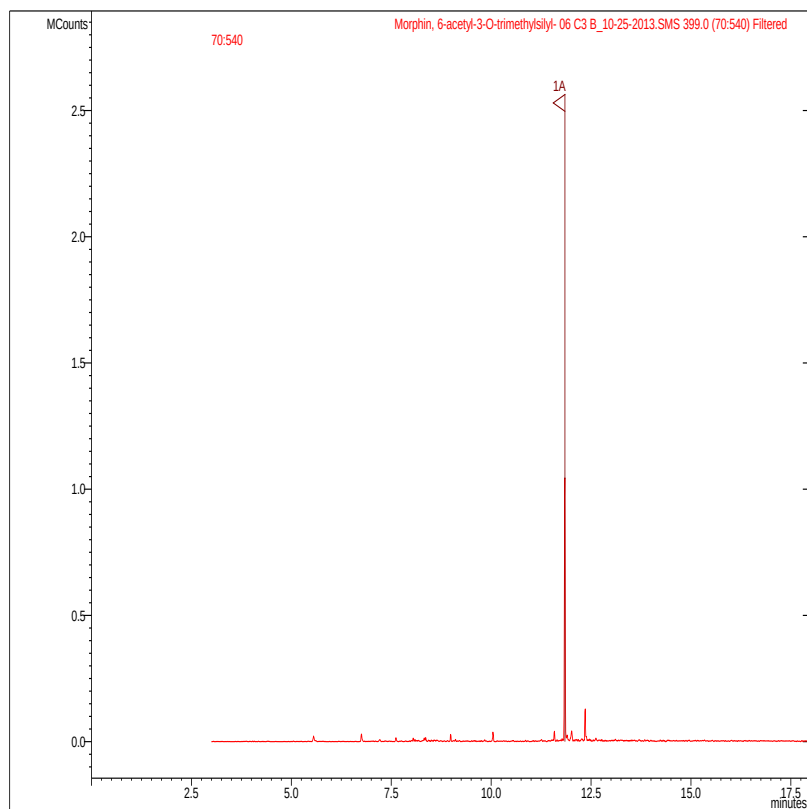


Fig. 3 :	Soluzione Test 6-MAM
	R.T. 11.84 6-MAM

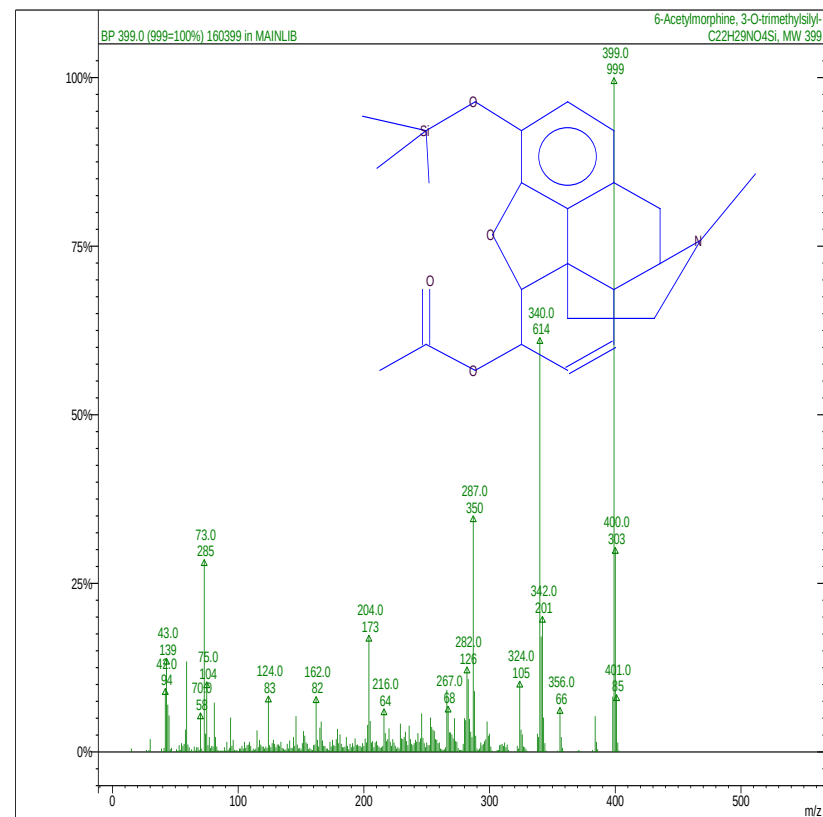


Fig. 4 :	Spettro di Massa della 6-MAM
	IONI MOLECOLARI: 399-340-287

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

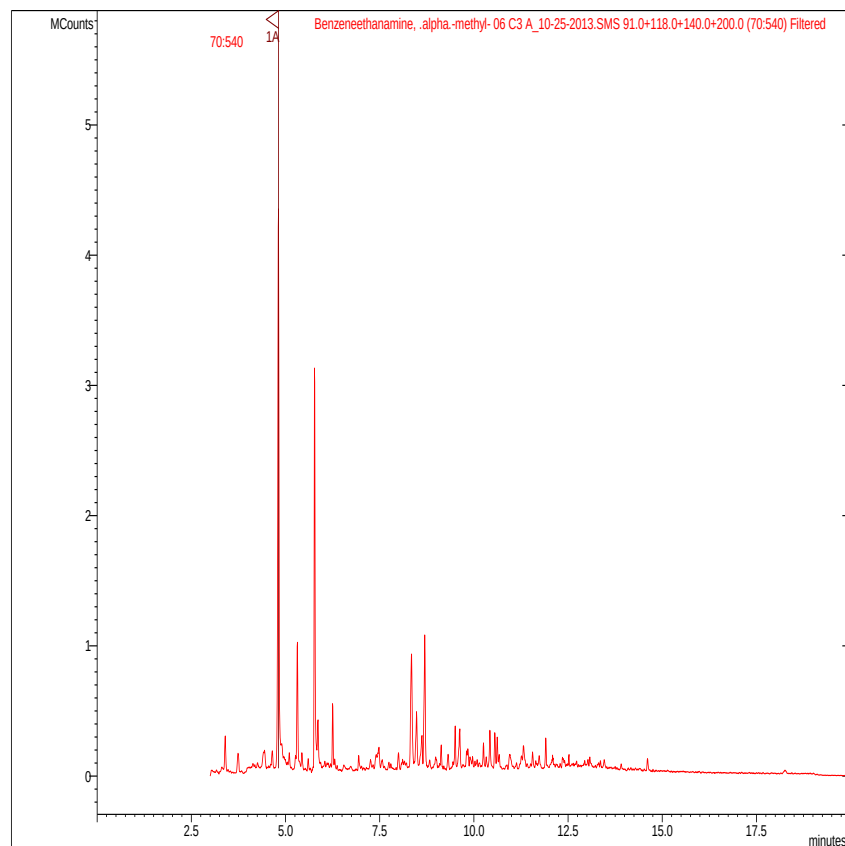


Fig. 5 :	Soluzione Test Amfetamina
	R.T. 4.81 Amfetamina

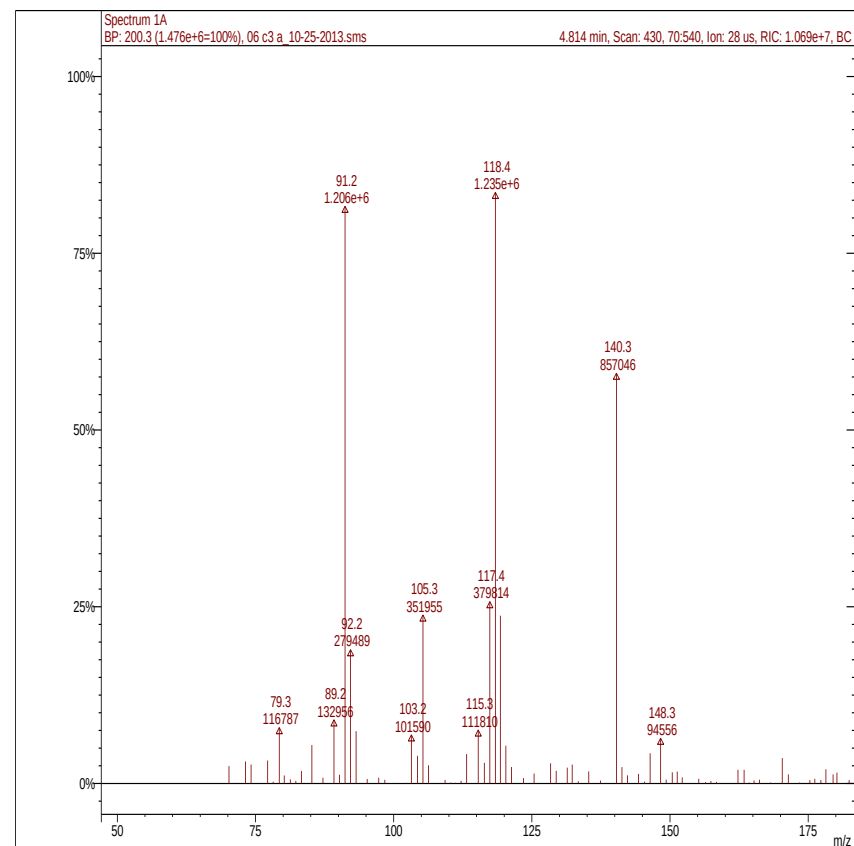


Fig. 6 :	Spettro di Massa della Amfetamina
	IONI MOLECOLARI: 91-118-140-200

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

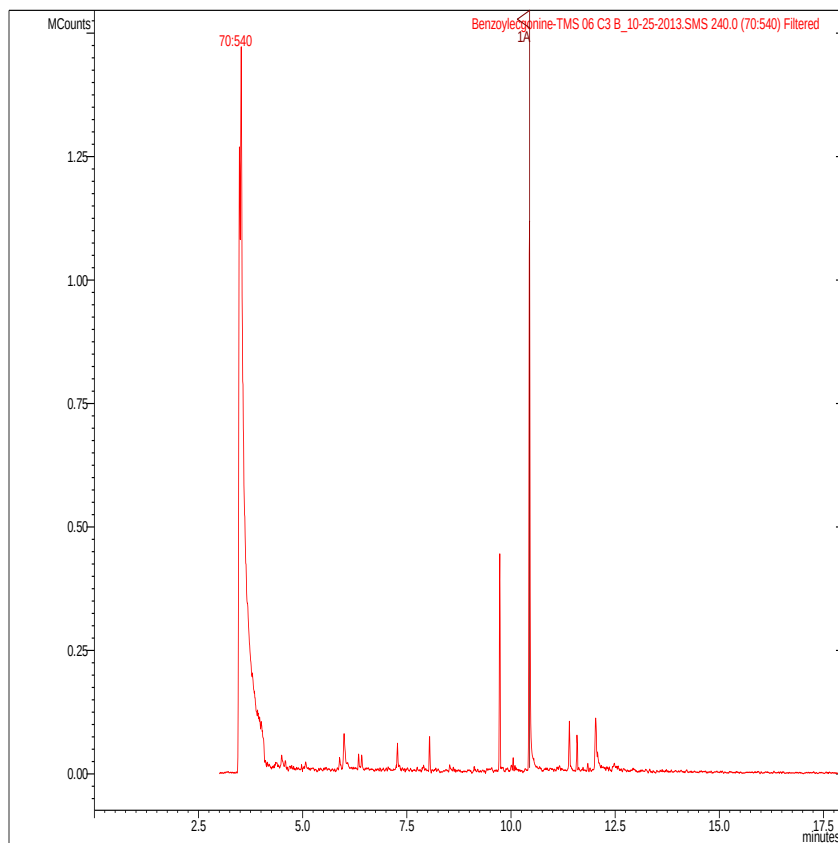


Fig. 7 :	Soluzione Test Beg
	R.T. 10.44 Beg

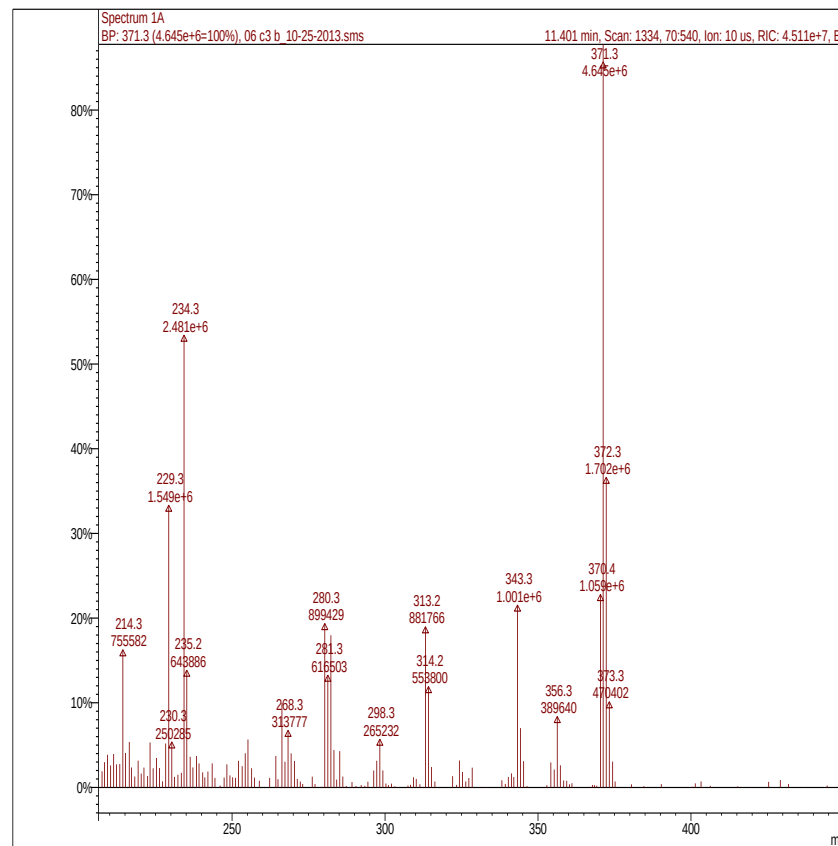


Fig. 8 :	Spettro di Massa della Beg
	IONI MOLECOLARI: 240-361-82

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

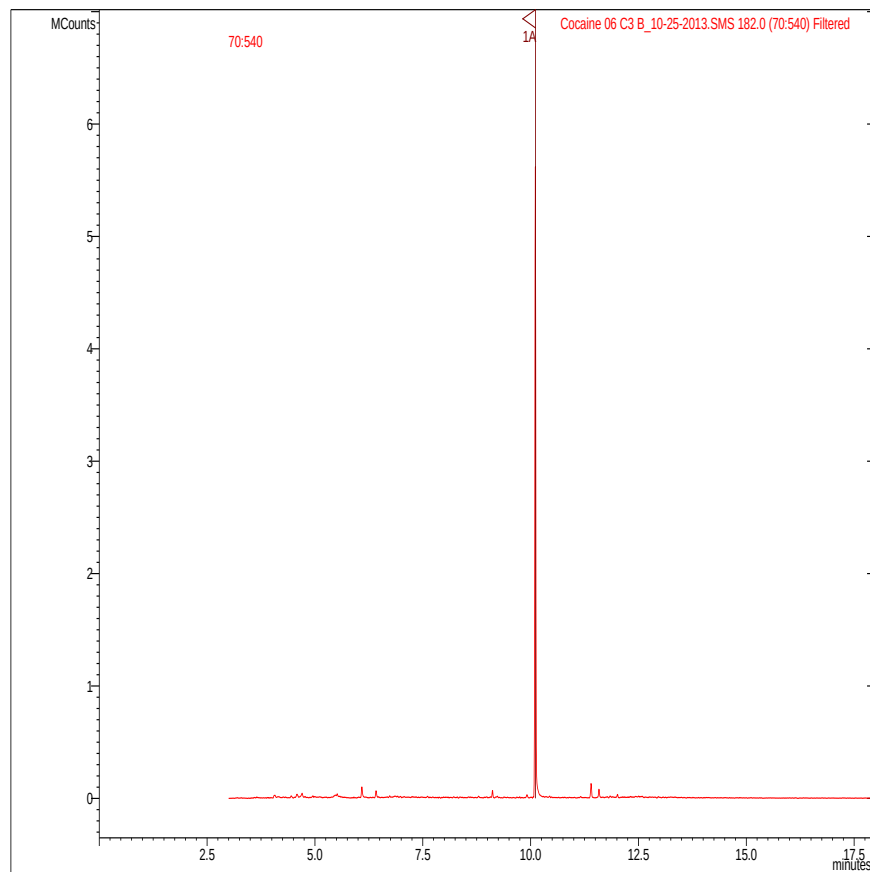


Fig. 9 :	Soluzione Test Cocaina
	R.T. 10.11 Cocaina

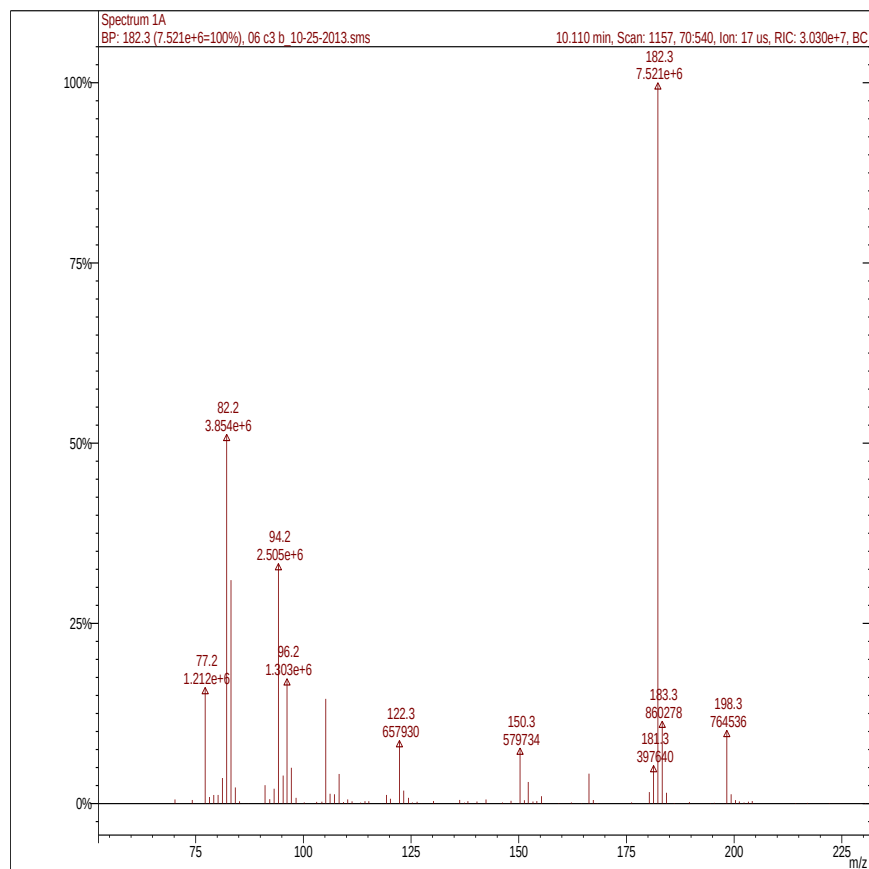


Fig. 10 :	Spettro di Massa della Cocaina
	IONI MOLECOLARI: 182-94-82

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

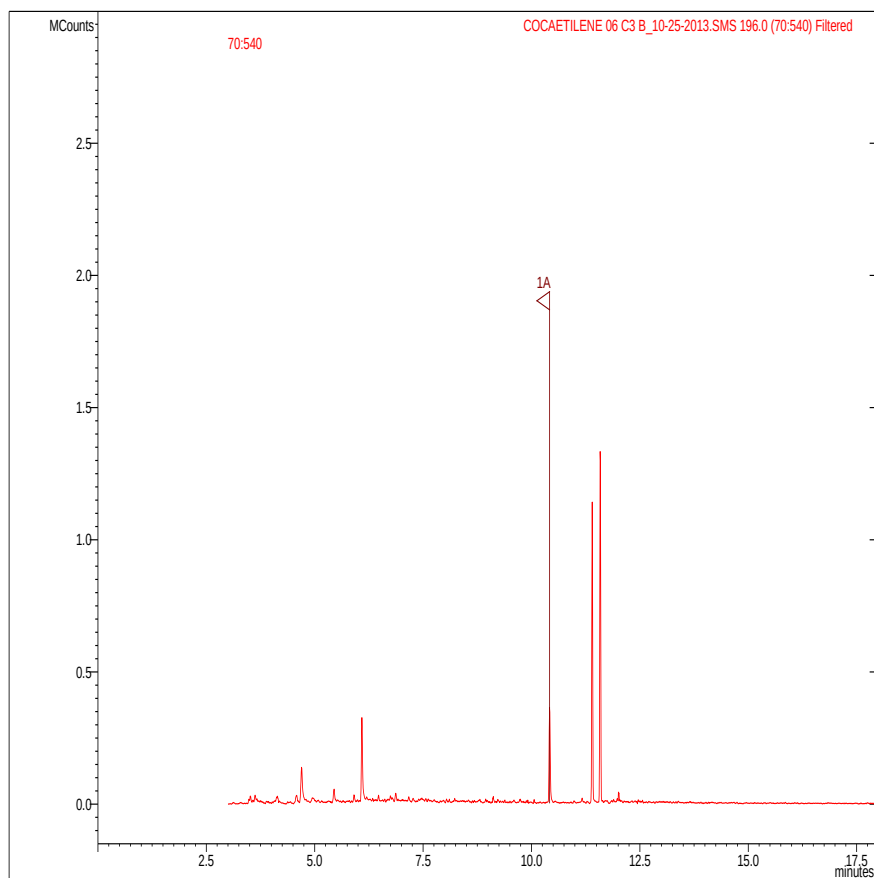


Fig. 11 :	Soluzione Test Cocaetilene
	R.T. 10.42 Cocaetilene

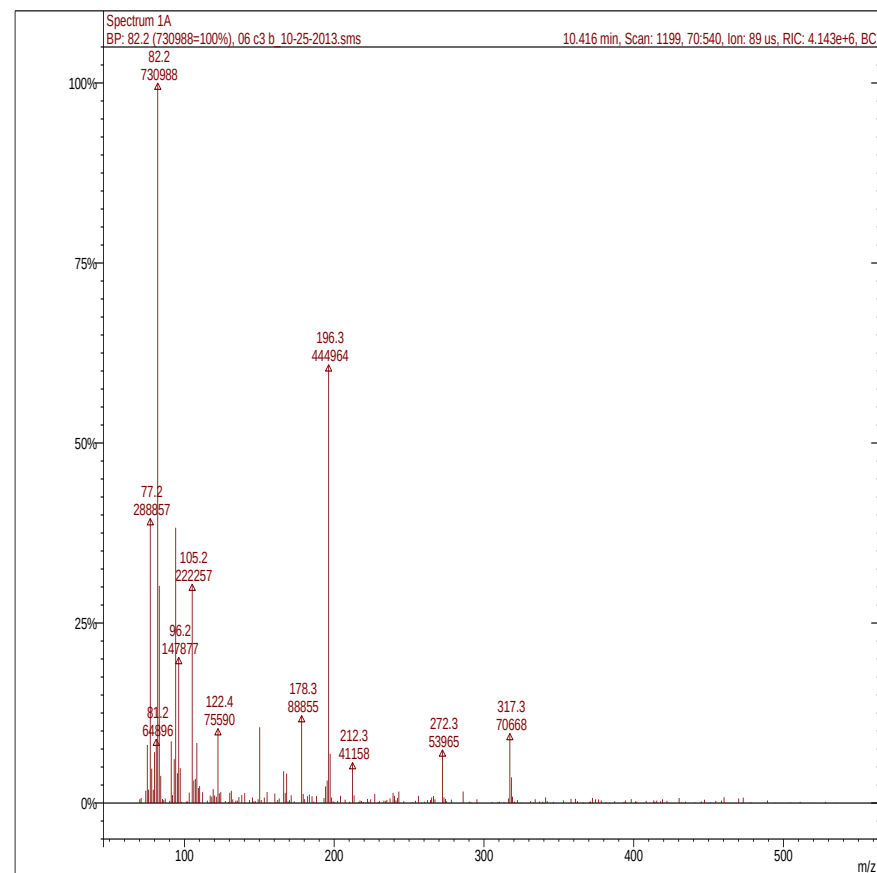


Fig. 12 :	Spettro di Massa della Cocaetilene
	IONI MOLECOLARI: 196-94-82

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

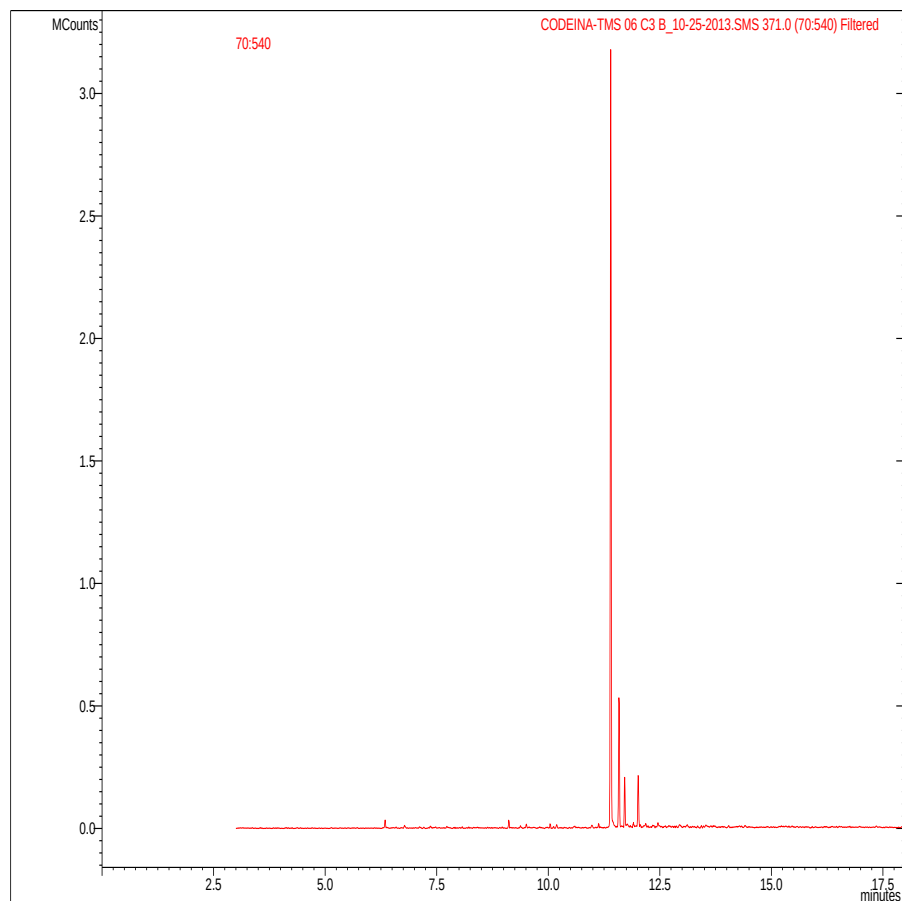


Fig. 13 : **Soluzione Test Codeina**
R.T. 11.40 Codeina

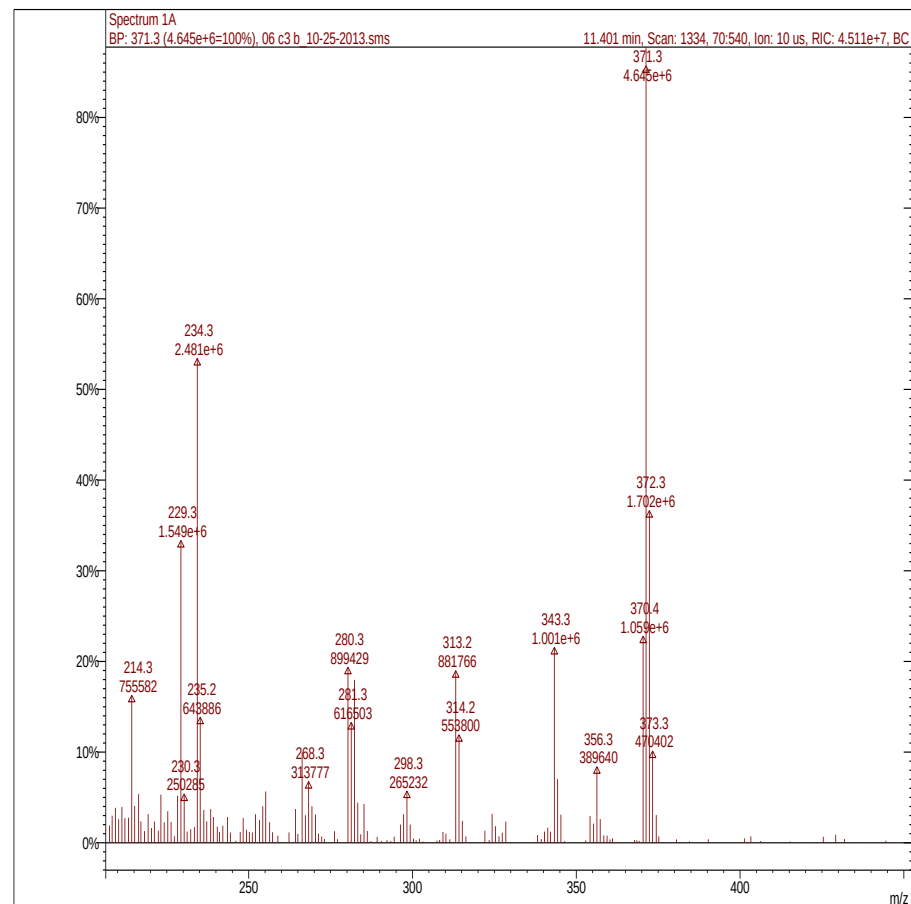


Fig. 14 : **Spettro di Massa della Codeina**
IONI MOLECOLARI: 371-234-343

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA (Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

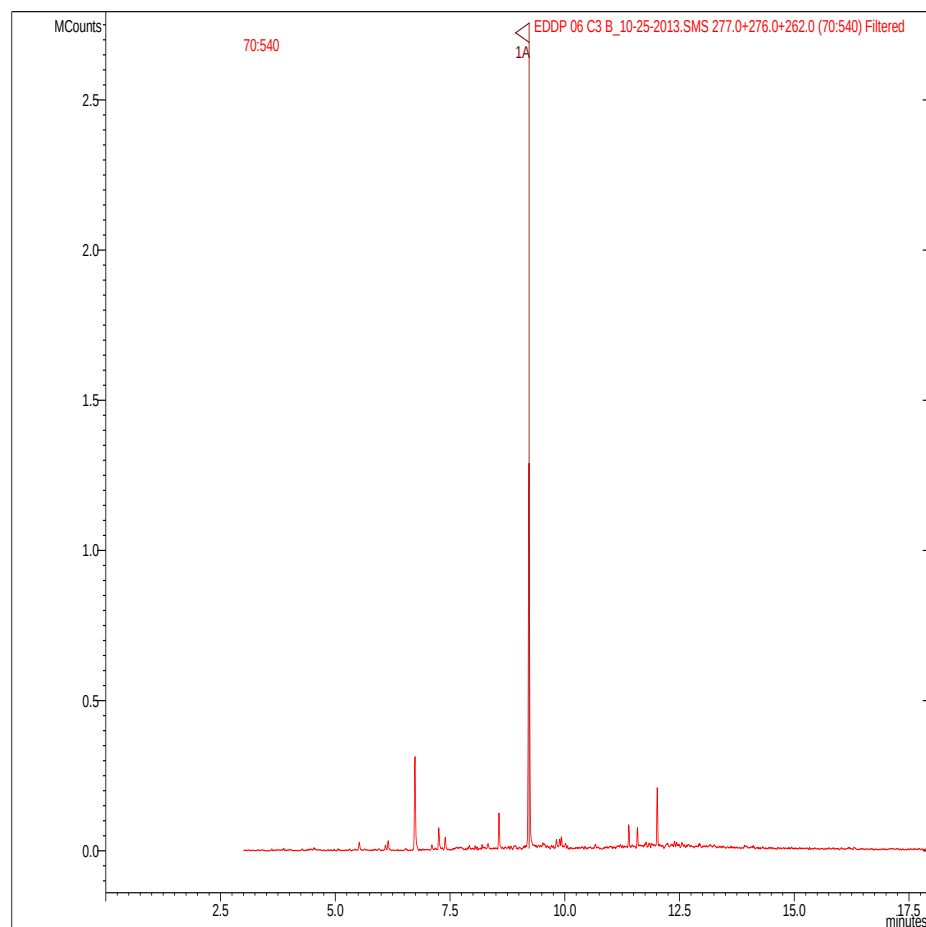


Fig. 15 : **Soluzione Test EDDP**
R.T. 9.22 EDDP

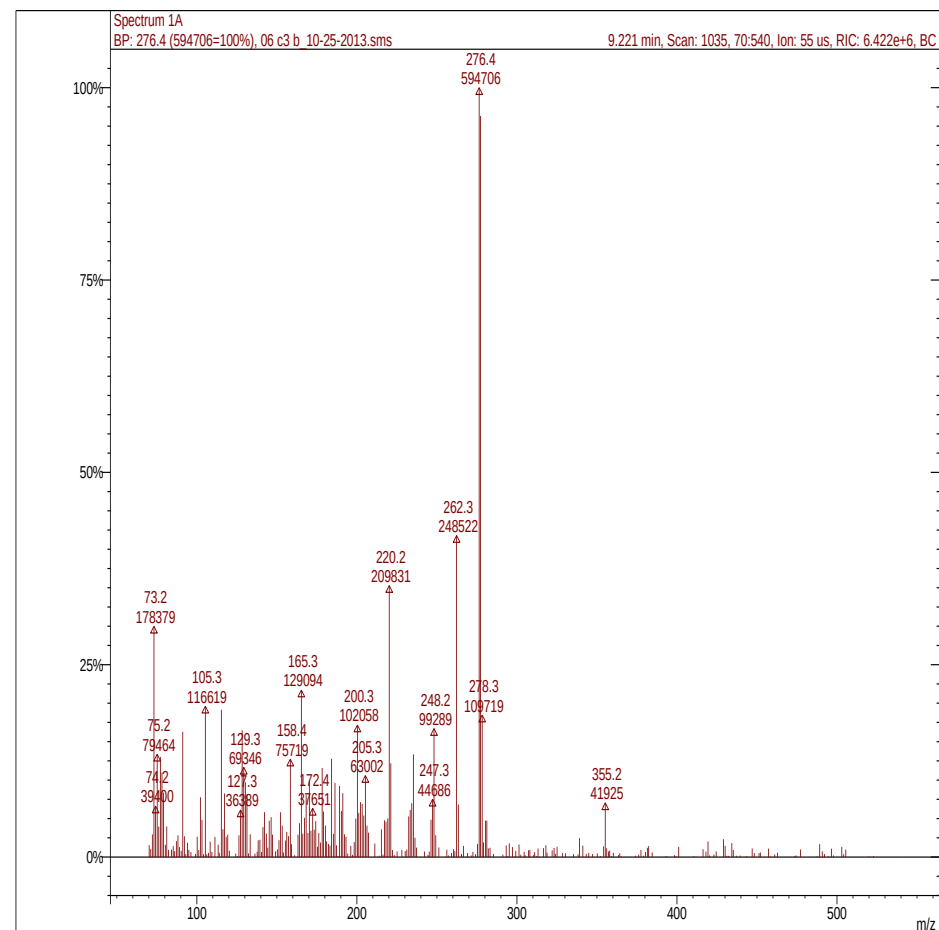


Fig. 16 : **Spettro di Massa dell'EDDP**
IONI MOLECOLARI: 276-277-262

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

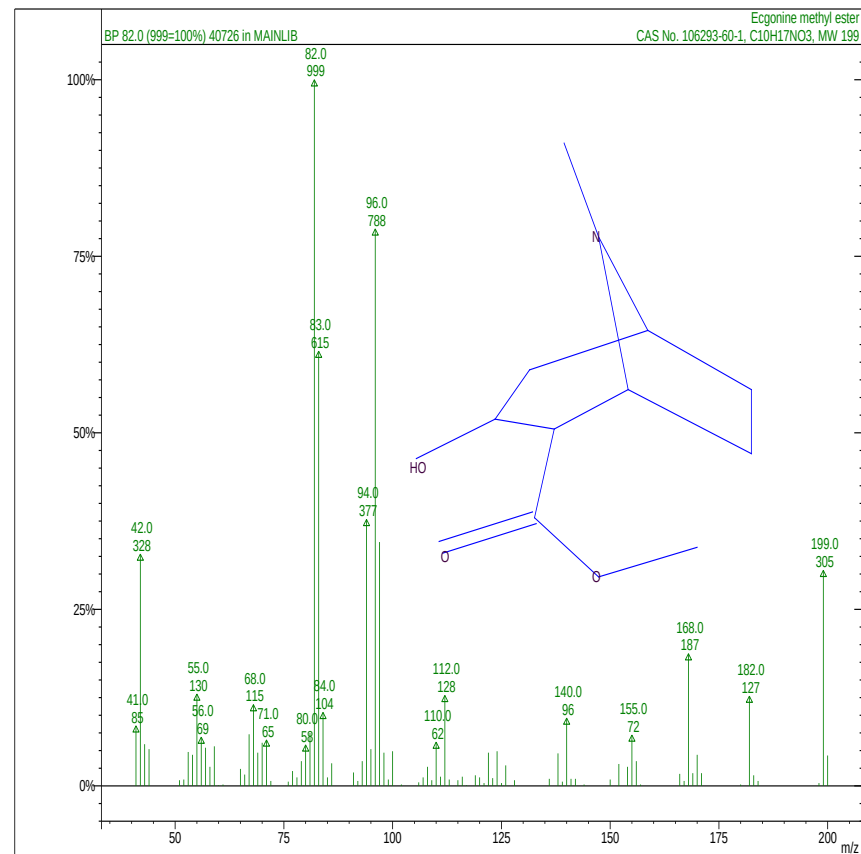
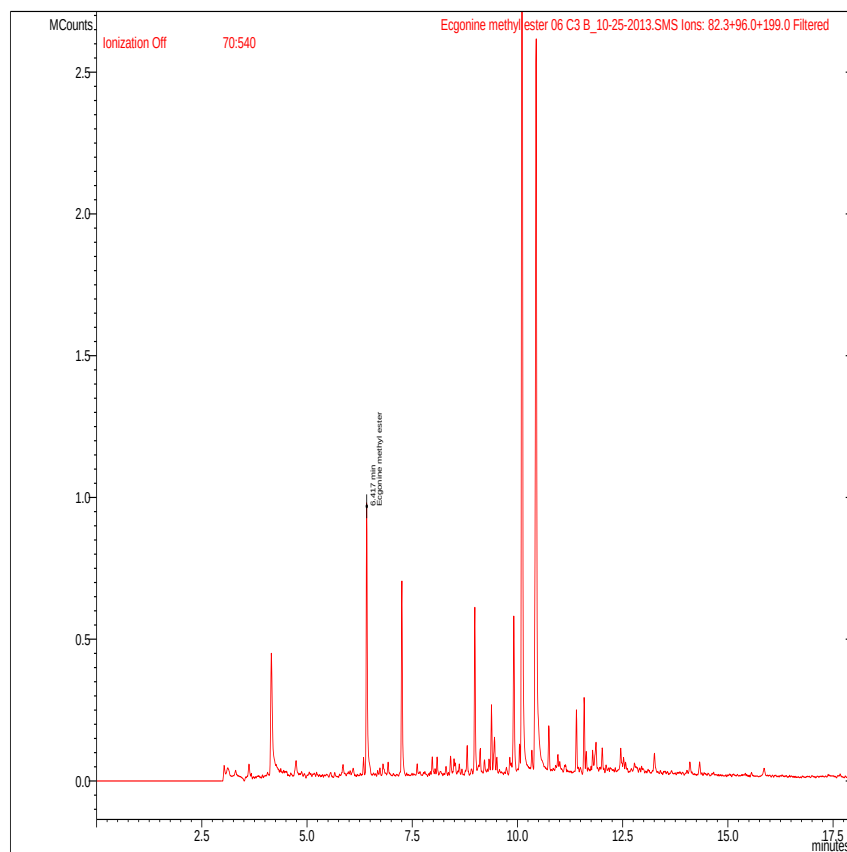


Fig. 17 :	Soluzione Test Ecgonina Metil Estere
	R.T. 6.42 Ecgonina Metil Estere

Fig. 18 :	Spettro di Massa della Ecgonina Metil Estere
	IONI MOLECOLARI: 82-96-199

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA (Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

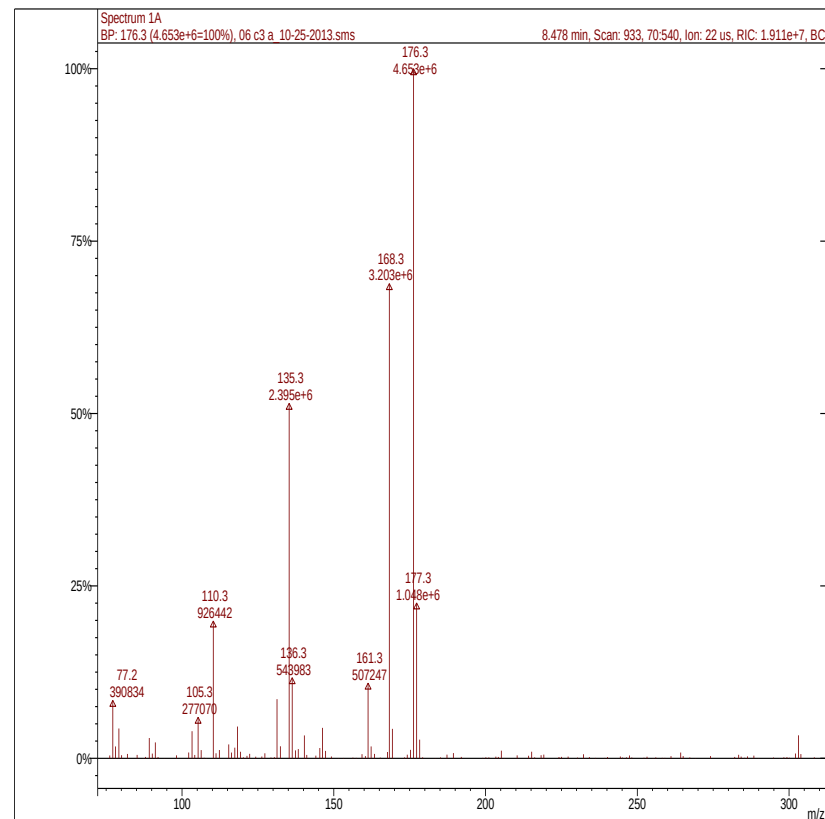
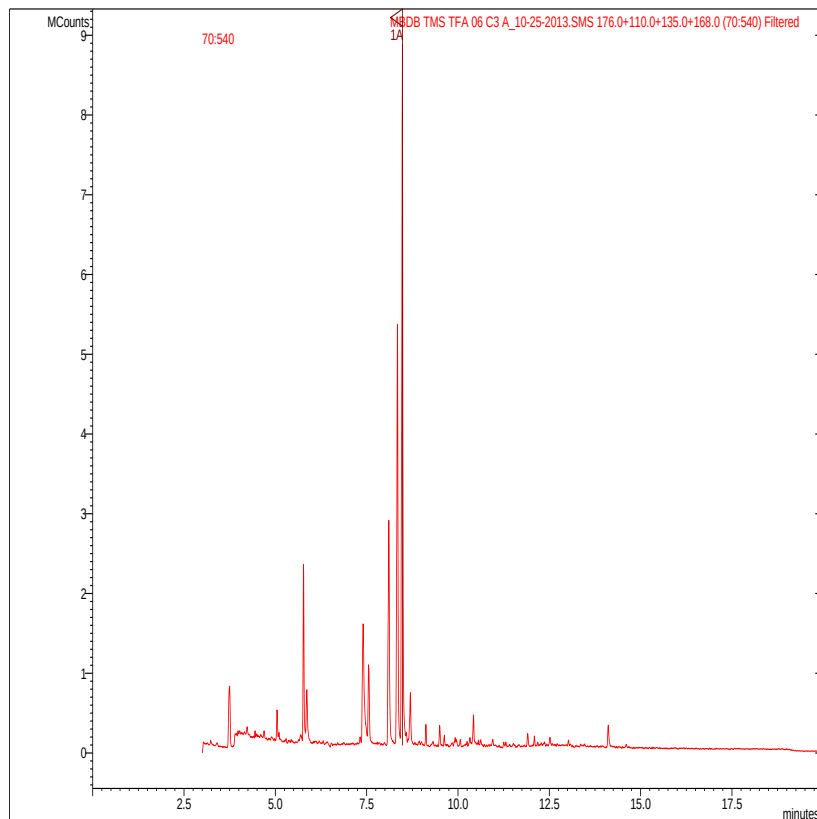


Fig. 19 :	Soluzione Test MBDB
	R.T. 8.48 MBDB

Fig. 20 :	Spettro di Massa dell' MBDB
	IONI MOLECOLARI: 176-168-135-110

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

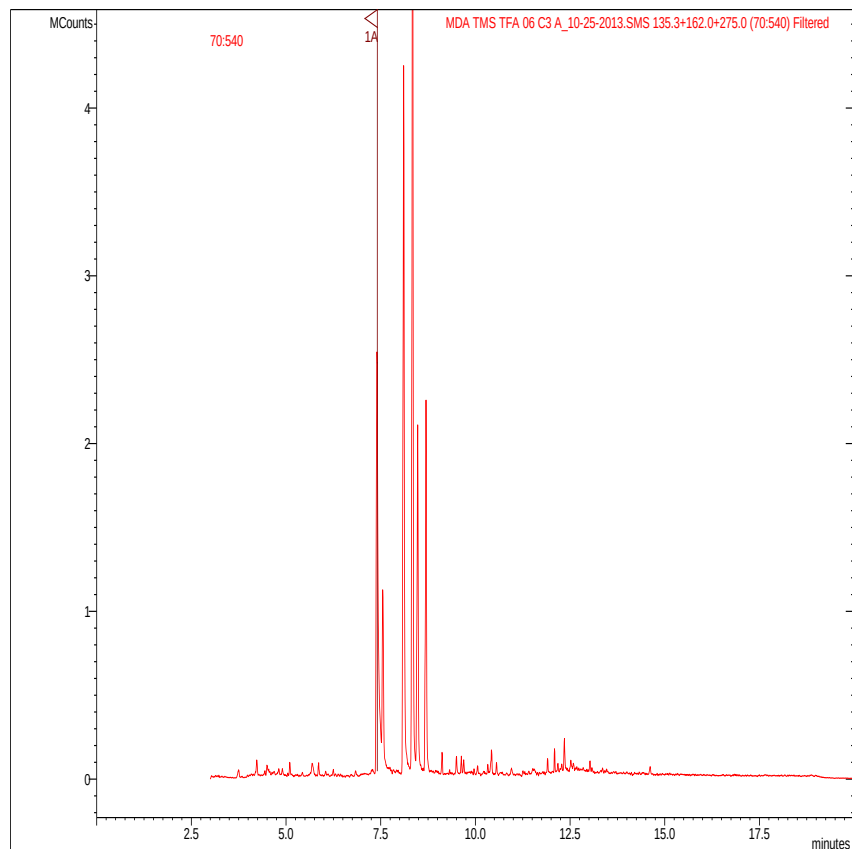


Fig. 21 :	Soluzione Test dell'MDA
	R.T. 7.40 MDA

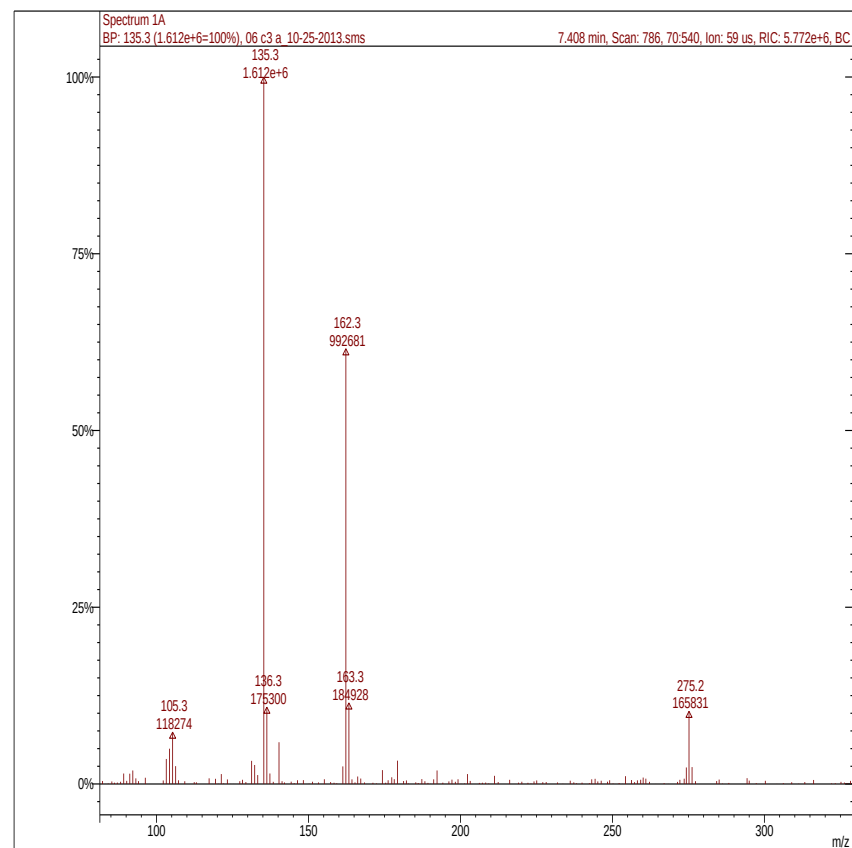


Fig. 22 :	Spettro di Massa dell' MDA
	IONI MOLECOLARI: 135-162-275

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

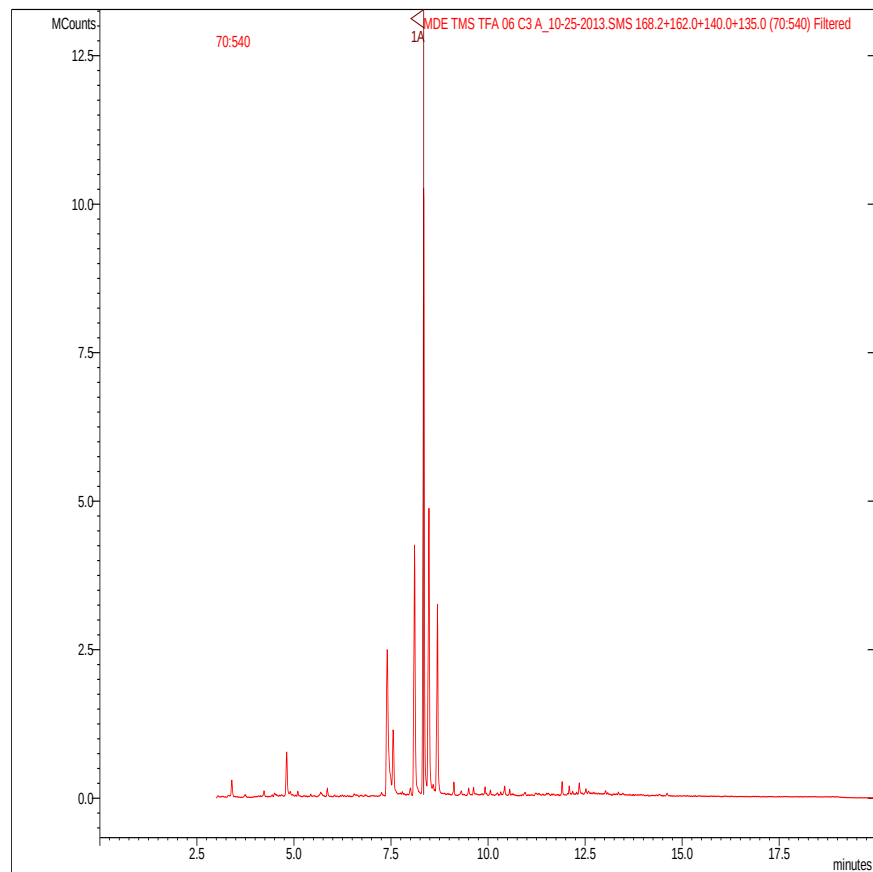


Fig. 23 :	Soluzione Test dell'MDE
	R.T. 8.34 MDE

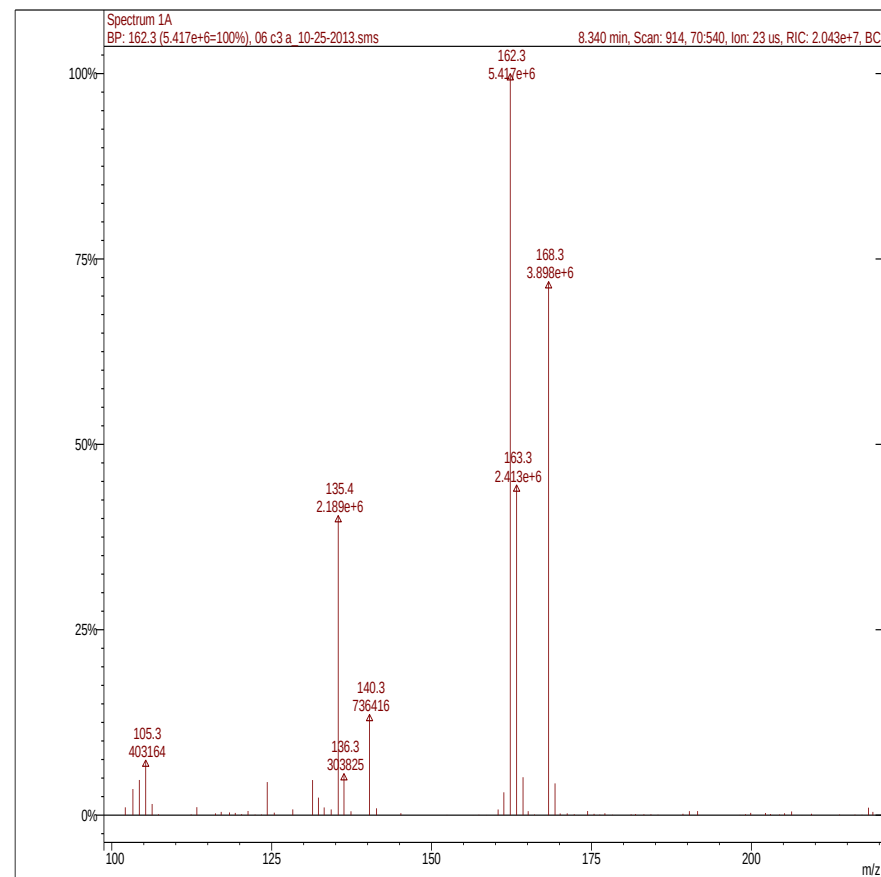


Fig. 24 :	Spettro di Massa dell' MDE
	IONI MOLECOLARI: 162-135-140-168

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

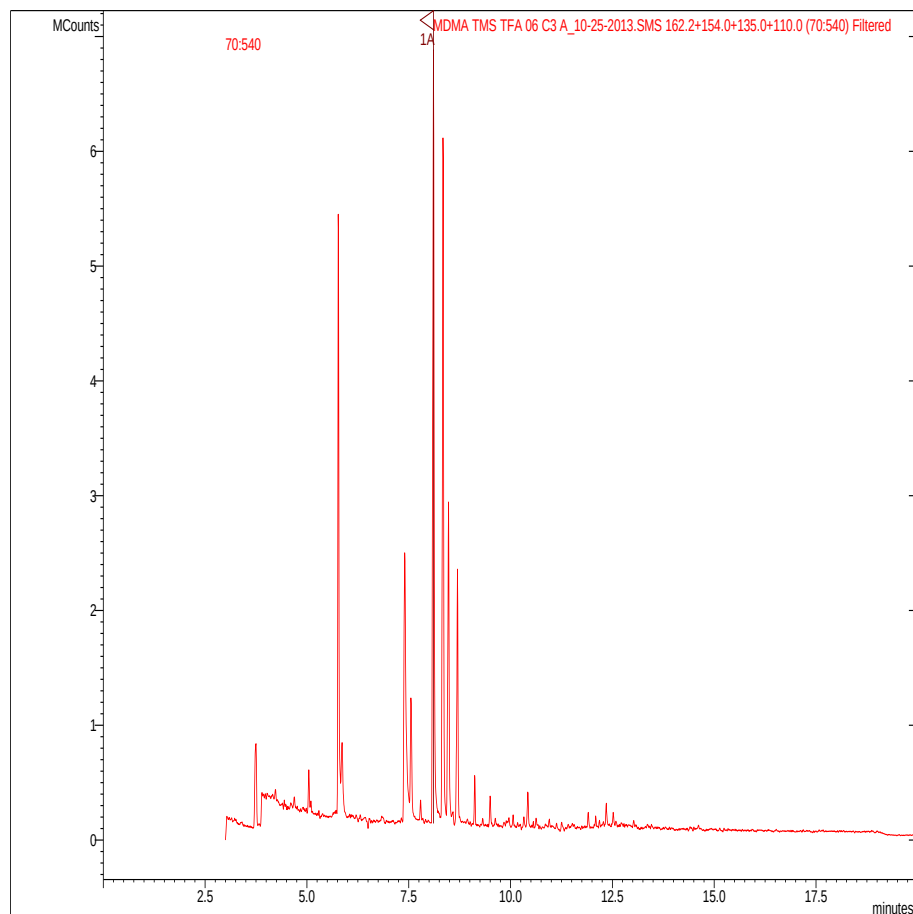


Fig. 25 :	Soluzione Test MDMA
	R.T. 8.10 MDMA

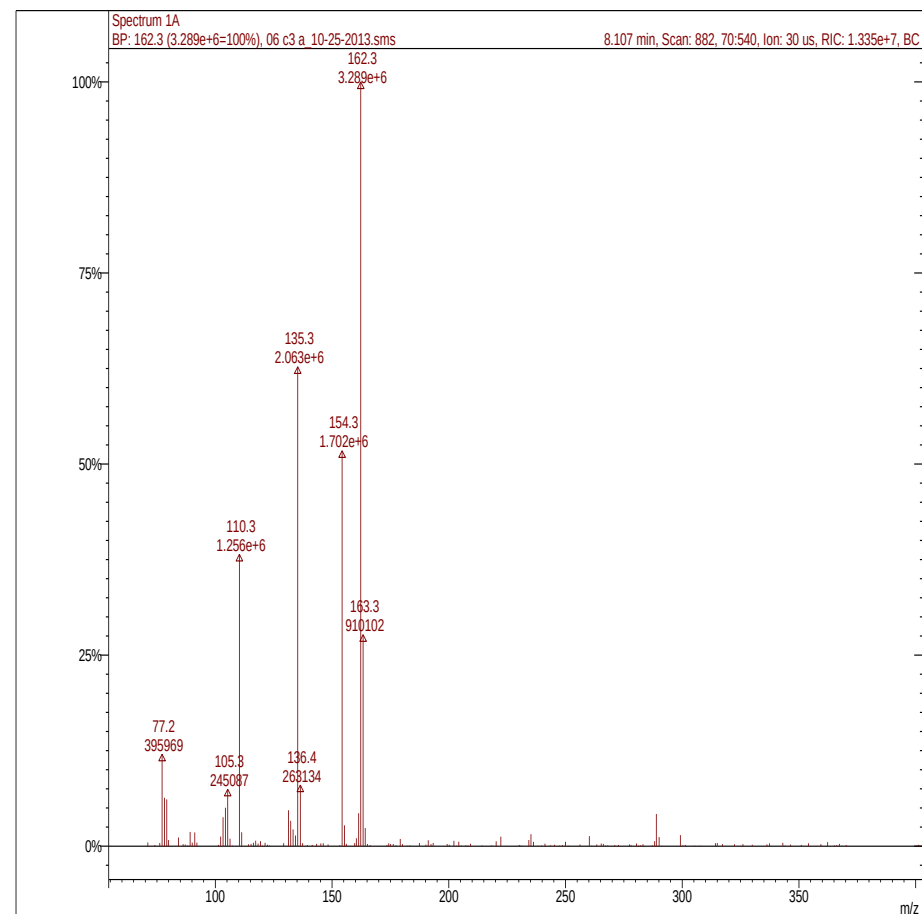


Fig. 26 :	Spettro di Massa dell' MDMA
	IONI MOLECOLARI: 162-110-135-154

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

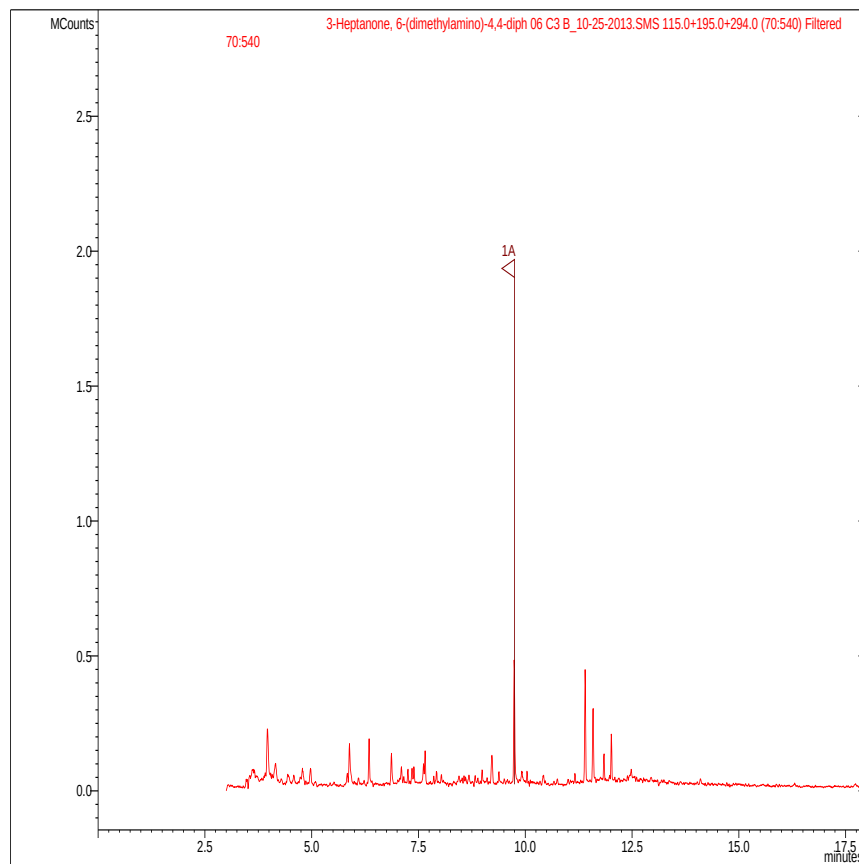


Fig. 27 :	Soluzione Test Metadone
	R.T. 9.75 Metadone

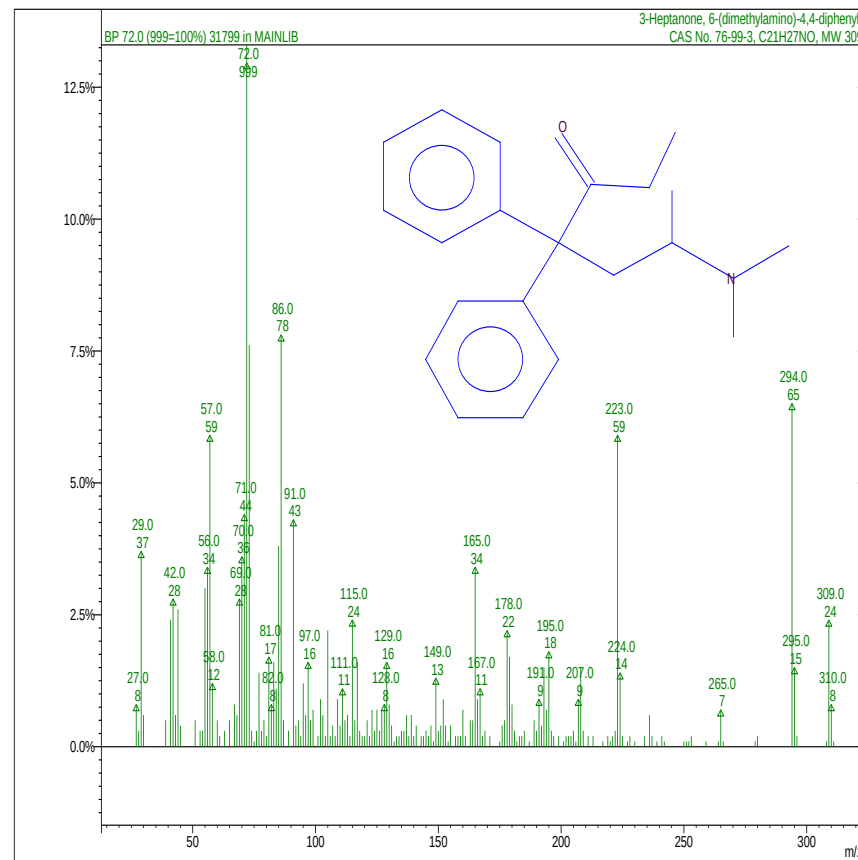


Fig. 28 :	Spettro di Massa del Metadone
	IONI MOLECOLARI: 165-115-294-72

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA (Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

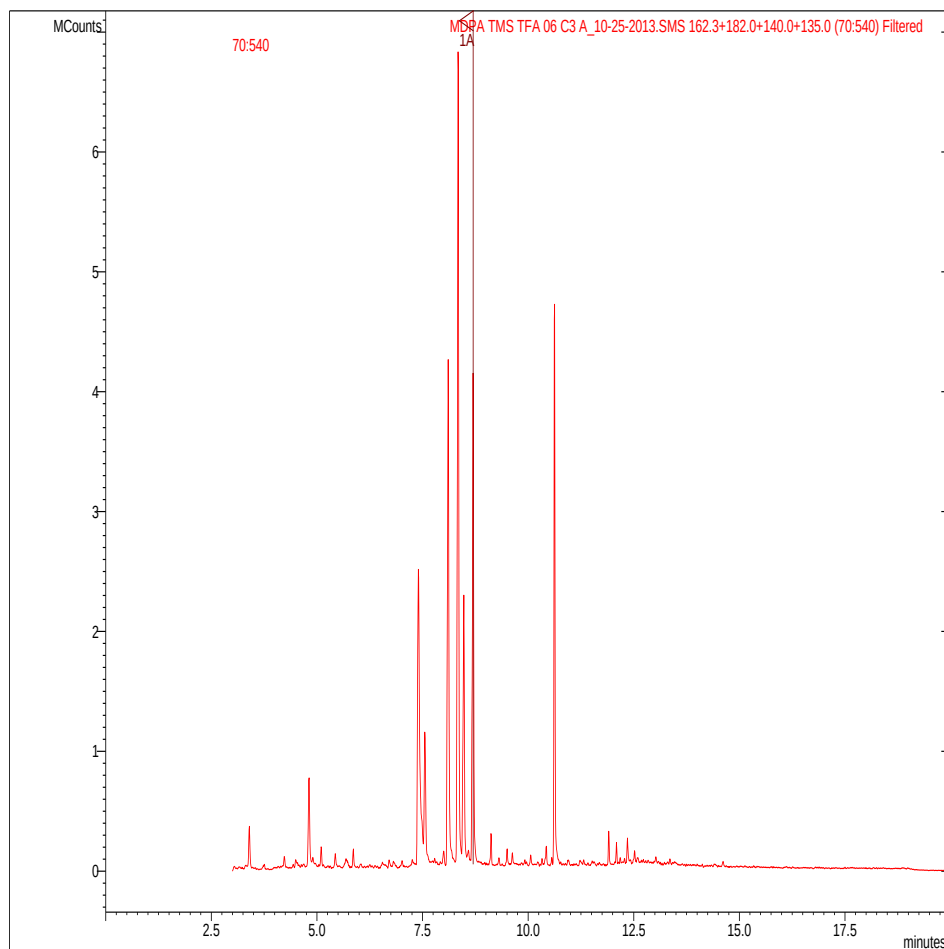


Fig. 29 :	Standard interno MDPA
	R.T. 8.70 MDPA

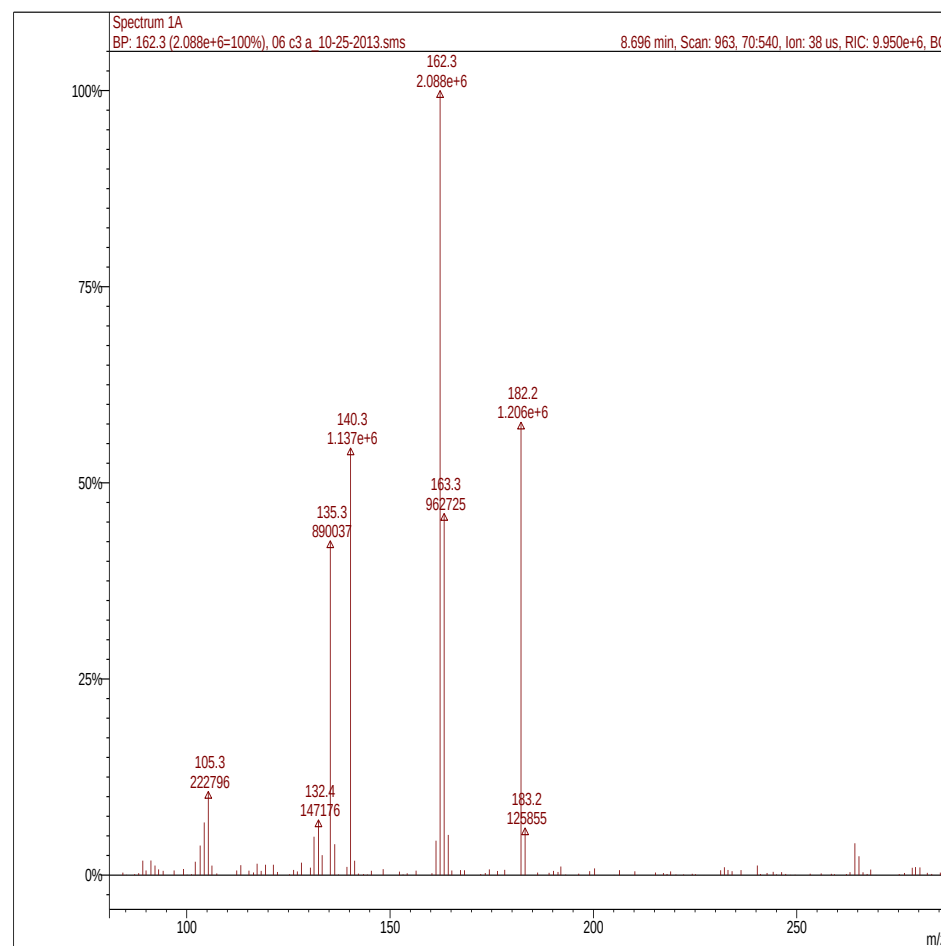


Fig. 30 :	Spettro di Massa dell' MDPA
	IONI MOLECOLARI: 162-182-140-135

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

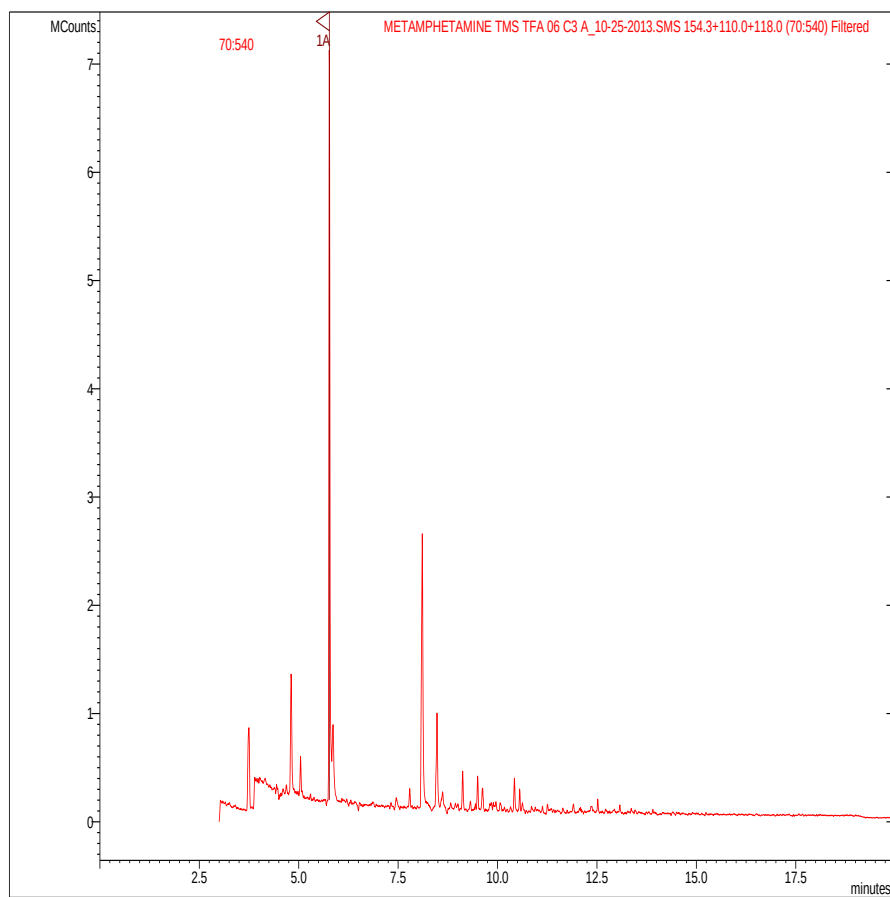


Fig. 31 :	Soluzione Test Metamfetamina
	R.T. 5.77 Metamfetamina

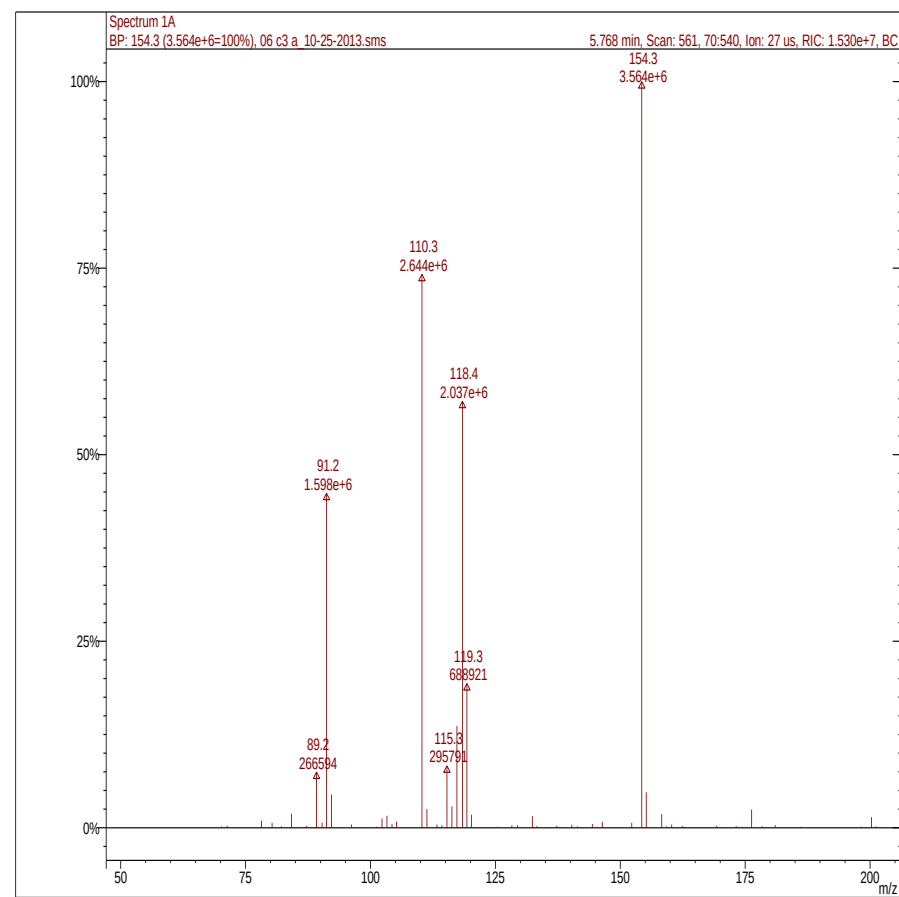


Fig. 32 :	Spettro di Massa della Metamfetamina
	IONI MOLECOLARI: 154-110-118-91

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

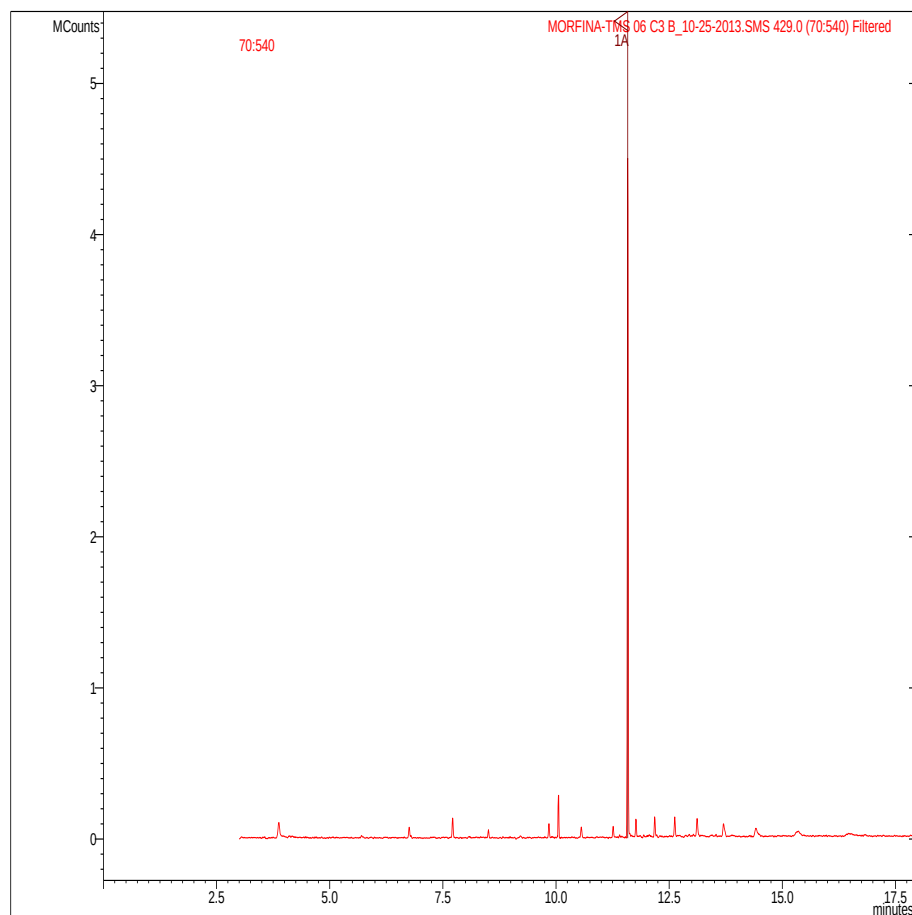


Fig. 33 : *Soluzione Test Morfina*
R.T. 11.58 Morfina

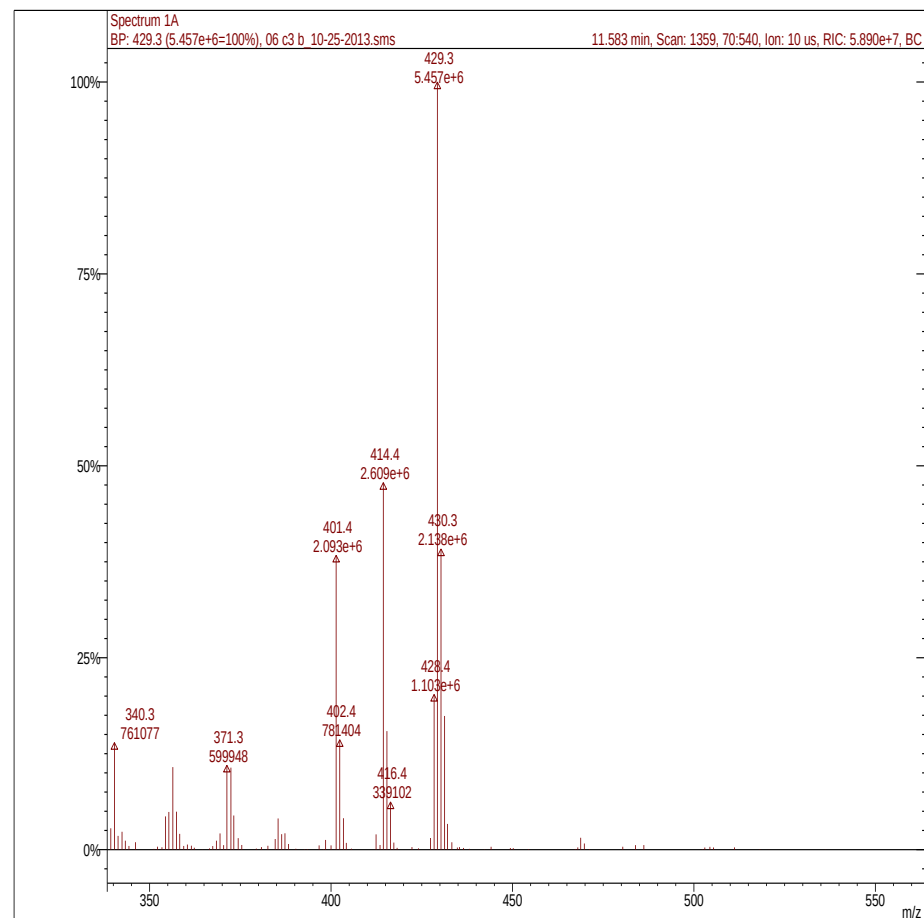


Fig. 34 : *Spettro di Massa della Morfina*
IONI MOLECOLARI: 429-414-401

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

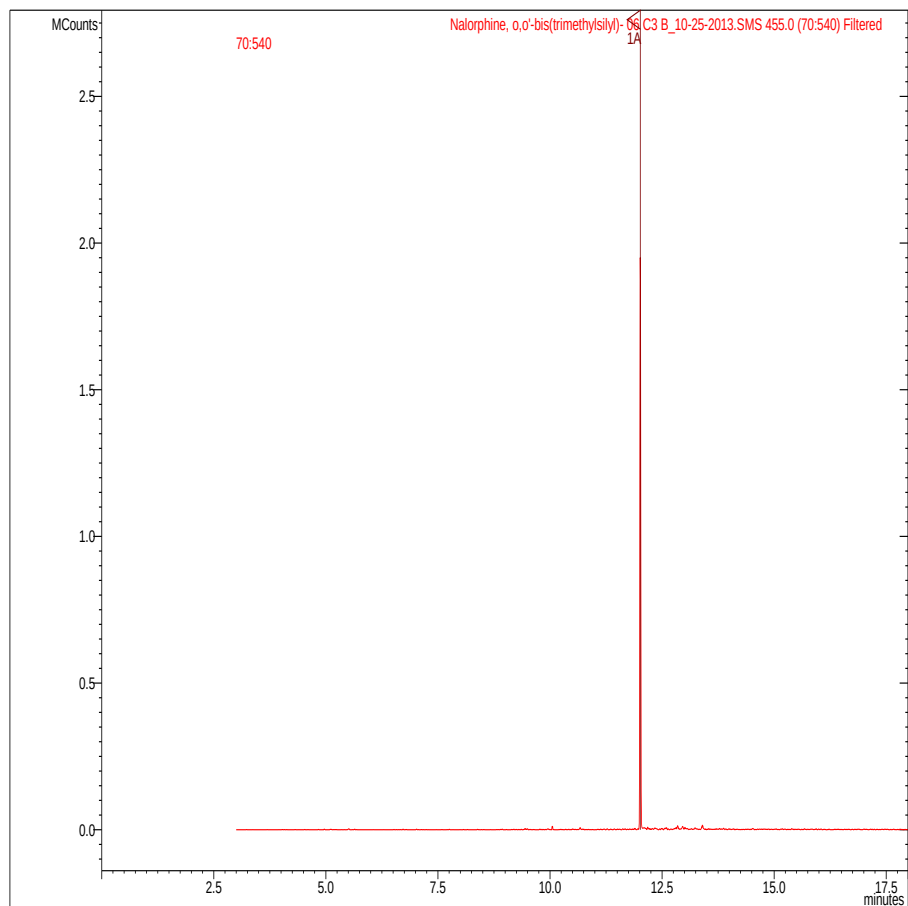


Fig. 35 : *Standard interno Nalorfina*

R.T. 12.01 Nalorfina

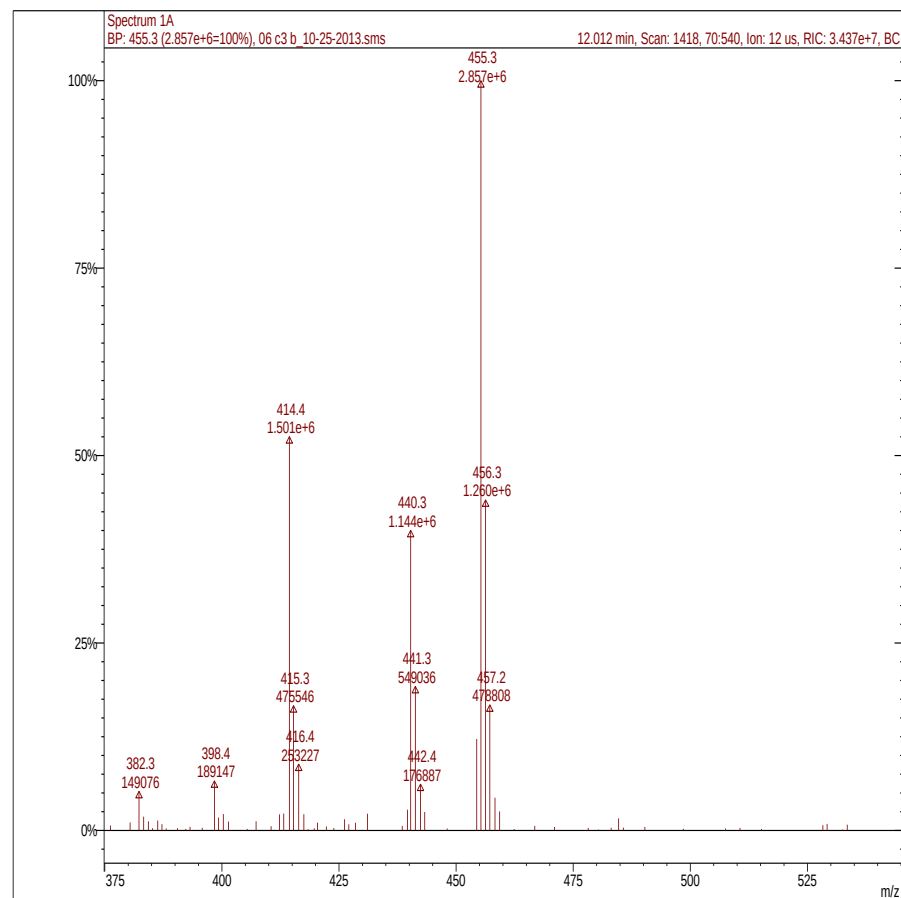


Fig. 36 : *Spettro di Massa della Nalorfina*

IONI MOLECOLARI: 455-440-414

SOSTANZE D'ABUSO IN MATRICE CHERATINICA
(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

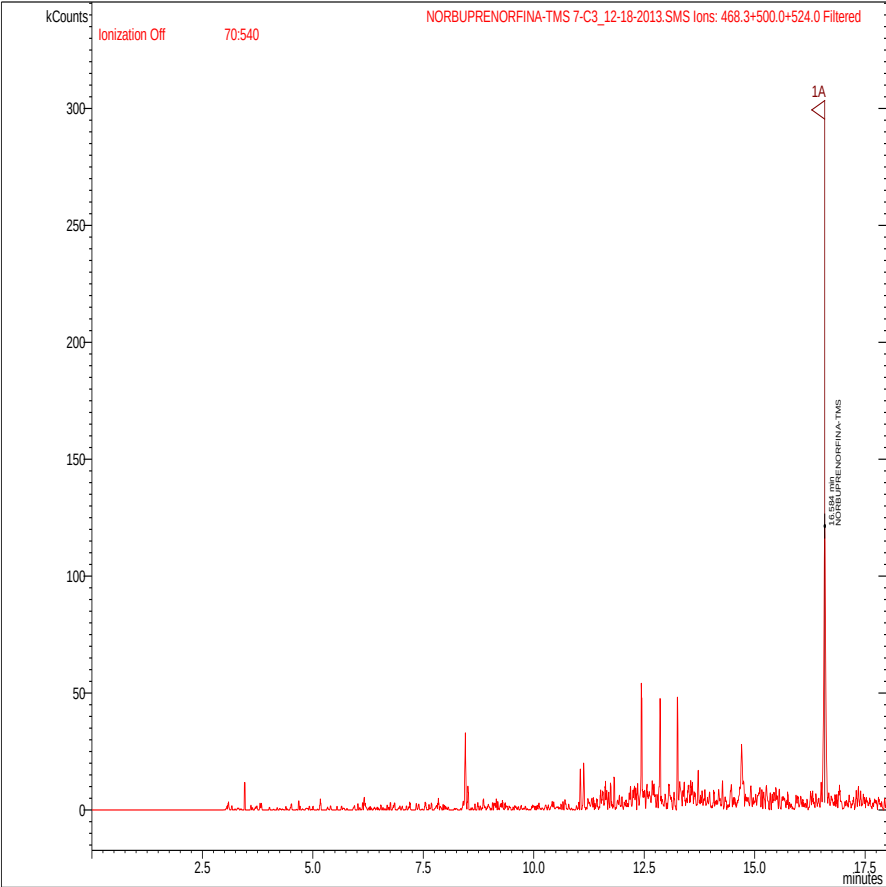


Fig. 37 :	Soluzione Test Norbuprenorfina
	R.T. 16.6 Norbuprenorfina

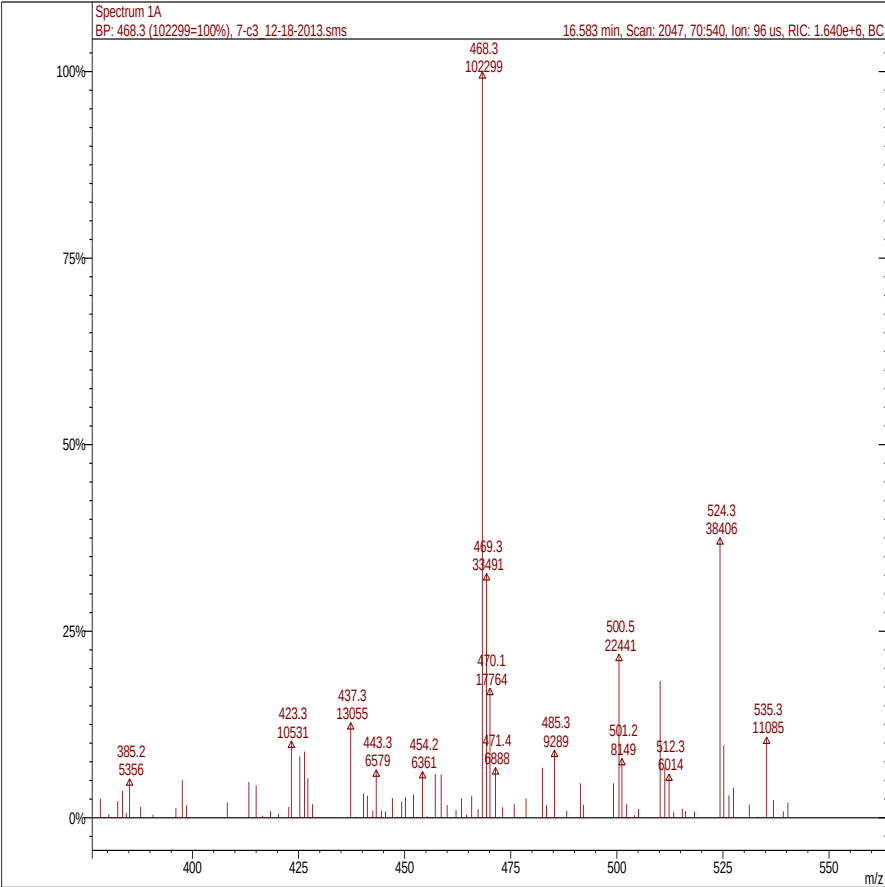


Fig. 38 :	Spettro di Massa della Norbuprenorfina
	IONI MOLECOLARI: 468-500-524